Aus der Hautklinik der Universität Düsseldorf
(Direktor: Prof. Dr. G. Plewig)

Einfluß von N-Acetylcystein auf die durch Hexachlorbenzol induzierte Porphyrie der Ratte

Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Helmut E. Brunner

Düsseldorf 1984

Univ.
LEIDEN
BIBL.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543905_0045

Aus der Hautklinik der Universität Düsseldorf
(Direktor: Prof. Dr. G. Plewig)

Einfluß von N-Acetylcystein auf die durch Hexachlorbenzol induzierte Porphyrie der Ratte

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Helmut E. Brunner

Düsseldorf 1984

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der

Universität Düsseldorf

Der Dekan
der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

gez.:Prof.Dr.A.Hopf

Referent
gez.: Prof.Dr.G.Goerz

Korreferent
gez.: Prof.Dr.H.Zimmermann

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

I. EINLEITUNG....1

I.1. Die Porphyrien....1

I.1.1 Definition der Porphyrie-Erkrankungen....1

I.1.2 Einteilung der Porphyrien....1 - 4

I.1.3 Klinik und klinisch-chemische Diagnostik....5 - 7

I.2. Chemie und Biochemie der Porphyrine....8

I.2.1 Chemische Strukturen....8

I.2.2 Porphyrinbiosynthese....8 - 14

I.3. Glutathion (GSH) und seine Beziehungen zur Haembiosynthese....15

I.3.1 Chemische Struktur....15

I.3.2 Schutzfunktion des GSH....15 - 18

I.4. Hexachlorbenzol (HCB)....19

I.4.1 HCB: Fungizid oder Auslöser der Porphyria turcica, sowie andere Porphyrogene der experimentellen Porphyrie....19

I.4.2 Die Türkische Porphyrie 1955....19

I.4.3 HCB im Tierversuch....19 - 20

I.4.4 Die HCB-induzierte Porphyrie der Ratte....20 - 21

I.5. Regelmechanismus der Haembiosynthese im Zusammenhang mit dem Cytochrom P-450-System....21

I.5.1 δ-Aminolävulinsäure-Synthase als "rate limiting enzyme"....21

I.5.2 Enzyminduktion und Cytochrom P-450-System.21 - 22

I.5.3 Cytochrom P-450-Isoenzyme....22 - 23

I.6. Indikation und Anwendung von N-Acetylcystein (NAC) in der Humanmedizin....24

I.7. Toxikologie, Pharmakokinetik und Metabolismus von N-Acetylcystein....25

I.8. Anwendung von N-Acetylcystein bei Paracetamol-Vergiftungen.....26

I.9. Problemstellung.....27

II. MATERIALIEN, VERSUCHSANORDNUNG UND METHODEN.....28

II.1. Chemikalien.....28

II.2. Geräte.....29

II.3. Versuchstiere und Versuchsanordnung..30 - 31

II.4. Methoden.....31

II.4.1 Gewinnung von Lebermikrosomen.....31

II.4.2 O-Desalkylierung von 7-Ethoxycumarin.32 - 33

II.4.3 Differenzierung der Cytochrom P-450-Isoenzyme durch spezifische Hemmer: Metyrapon und α-Naphthoflavon.....34

II.4.4 Bestimmung der Aktivität der Aminopyrin- N-Demethylase (ADM).....35 - 36

II.4.5 Bestimmung der Aktivität der Arylhydrocarbonhydroxylase (AHH).....36 - 37

II.4.6 Bestimmung des Cytochrom P-450-Gehaltes.....38

II.4.7 Bestimmung des Glutathion-Gehaltes...38 - 39

II.4.8 Bestimmung der δ-Aminolävulinsäure-Synthase (ALA-Synthase) in der Leber.39 - 40

II.4.9 Bestimmung der Porphyrine und Porphyrinvorstufen: δ-Aminolävulinsäure und Porphobilinogen im Urin....40 - 41

II.4.10 Bestimmung der Gesamt-Porphyrine in der Leber.....42

II.4.11 Isolierung, Veresterung und Auftrennung der Porphyrinmetaboliten....43

III. ERGEBNISSE.....44

III.1. Mikrosomales Protein.....44 - 45

III.2. Beeinflussung der 7-EOC-Deethylase....46 - 48

III.3. Differenzierung der P-450-Isoenzyme...49 - 50

III.4. Aktivität der Aminopyrin-N-Demethylase (ADM).....51 - 52

III.5. Aktivität der Arylhydrocarbonhydroxylase (AHH).....53 - 54

III.6. Cytochrom P-450-Gehalt.....55 - 56

III.7. Gesamt-Glutathion-Gehalt der Leber....57 - 58

III.8. Aktivität der δ-Aminolävulinsäure-Synthase (ALA-Synthase) in der Leber..59 - 60

III.9. Gesamt-Porphyrin-Gehalt der Leber.....61 - 62

III.10. Gesamt-Porphyrin-, δ-Aminolävulinsäure(ALA)- und Porphobilinogen(PBG)-Ausscheidung im Urin.....63 - 66

III.11. Verteilungsmuster der Porphyrin-Metaboliten im Urin.....67 - 69

III.12. Verteilungsmuster der Porphyrin-Metaboliten in der Leber.....70 - 71

IV. DISKUSSION.....72 - 74

V. ZUSAMMENFASSUNG.....75

VI. ABKÜRZUNGEN.....76

VII. LITERATUR.....77 - 88

I. Einleitung

I.1. Die Porphyrien

I.1.1 Definition der Porphyrie-Erkrankungen

Porphyrien sind Stoffwechselstörungen des Menschen, (bzw. der Tiere), die mit einer vermehrten Bildung, Speicherung und Ausscheidung von Porphyrinen einhergehen. Die Ablagerung erfolgt in erster Linie in den Hauptbildungsorten - der Leber und den Erythrozyten, aber auch in der Haut.
Die besser wasserlöslichen Porphyrine, hochcarboxylierte Porphyrine: Uro- und Heptaporphyrine werden bevorzugt mit dem Urin ausgeschieden, während die lipophilen Porphyrine, niedrig carboxylierte Porphyrine, z.B. Kopro- und Protoporphyrine über die Galle, und so mit dem Stuhl eliminiert werden (29).

Die Grundlagen der Porphyrienkrankheiten - der Porphyrien im eigentlichen Sinn - sind angeborene Störungen der Enzyme der Haembiosynthese; nur ausnahmsweise sind diese Störungen ausschließlich exogen bedingt. Diese erworbenen Erkrankungen der Leber oder der Erythrozyten (z.B. bei der Hämolyse) können mit einer Vermehrung der Koproporphyrin-Ausscheidung verbunden sein. Derartige Störungen bezeichnet man dann exakter als Porphyrinurie, nicht aber als Porphyrie (33).

I.1.2 Einteilung der Porphyrien

Die wichtigsten Organe für die Haembiosynthese sind das Knochenmark und die Leber. Bei den verschiedenen Formen der Porphyrien sind je nach Bevorzugung diese Organe unterschiedlich stark betroffen, so daß man

zwei Hauptformen

die erythropoetische Form
und
die hepatische Form
der Porphyrien unterscheidet (15).

Formen:

A) Erythropoetische Porphyrien

1. Porphyrie erythropoetica congenita = M.Günther (CEP = Congenital erythropoietic porphyria)
2. Erythropoetische Protoporphyrie (EPP)

B) Hepatische Porphyrien

1. Porphyria acuta intermittens (AIP)
2. Porphyria variegata (PV)
3. Hereditäre Koproporphyrie (HC)
4. Porphyria cutanea tarda (PCT)

Die Porphyria acuta intermittens (AIP), die hereditäre Koproporphyrie (HC) und die Porphyria variegata (PV) werden auch als akute Porphyrien zusammengefaßt, weil eine akute Krise der Krankheit durch Induktoren der δ-Aminolävulinsäure-Synthase (ALA-Synthase oder des P-450 Systems ausgelöst werden kann (33). Kürzlich wurde von DOSS et al. (1980) (18) eine weitere Form, auf einen Defekt der ALA-Dehydratase (PBG-Synthase) beruhend, beschrieben.

Bei den erythropoetischen Formen führt der angeborene Enzym-Defekt obligat zu einer Erkrankung: Erythropoetische Protoporphyrie (EPP) und congenitale erythropoetische Porphyrie (CEP) (32).

Im Gegensatz dazu führt jedoch der Enzymdefekt bei den meisten hepatischen Porphyrien nicht obligat zur klinischen Manifestation. Erst die gleichzeitige Einwirkung von bestimmten Arzneimitteln kann zu einem Anfall bei den "Acuta-Formen" führen: Porphyria acuta intermittens (AIP), Porphyria variegata (PV) und hereditäre Koproporphyrie (HC) (32,33).

Im Gegensatz hierzu ist für die Manifestation der Porphyria cutanea tarda (PCT) wahrscheinlich eine jahrelange Einwirkung von Porphyrogenen notwendig. Unter Porphyrogenen verstehen wir chemische Substanzen, die bei entsprechender Applikation eine Porphyrie auslösen können (83). Als Manifestationsfaktoren spielen Umweltnoxen, wie z.B. Blei, Schwermetalle und halogenierte Kohlenwasserstoffe (Hexachlorbenzol, Pentachlorbenzol, chlorierte Benzdioxine und andere) eine Rolle (29,33,73). Beim Menschen haben vorherrschend Pharmaka eine große Bedeutung, insbesondere lipophile Pharmaka, die durch das Cytochrom P-450-System metabolisiert werden und das Cytochrom P-450-System gleichzeitig induzieren können (85). Alkohol, ein Induktor der ALA-Synthase bzw. der alkoholinduzierte Leberschaden, spielt in allen Ländern der Erde als Porphyrogen eine maßgebliche Rolle (81). Von besonderer Bedeutung ist wahrscheinlich das Eisen, da es Enzyme der Haembiosynthese, z.B. die Uroporphyrinogen-Decarboxylase (URO-D), hemmt und somit die PCT induziert (46). Aber auch andersartig ausgelöste Leberschäden, so z.B. die durch eine Virus-Hepatitis induzierte Leberveränderung können als Manifestationsfaktoren für die PCT bedeutungsvoll sein (29).

Eine besondere Bedeutung haben die experimentellen Porphyrogene: AIA = Allylisopropylacetamid,

Univ. LEIDEN BIBL.

DDC = Diäthyl-1.4-Dihydro-2.4.6 trimethylpyridin 3,5 dicarboxylat und HCB = Hexachlorbenzol erlangt, weil mithilfe dieser Substanzen tierexperimentelle Porphyrien erzeugt werden und der Porphyrinstoffwechsel besser erforscht werden konnte.
Diese Substanzen bewirken über völlig verschiedene biochemische Mechanismen obligat eine Porphyrie.

AIA bewirkt einen verstärkten Haemabbau und führt über einen entsprechenden Haemmangel zu einer Induktion der ALA-Synthase und so zu einer Porphyrie mit einer vorherrschenden Koproporphyrin-Ausscheidung. (83)

DDC hemmt die Ferrochelatase und induziert eine Porphyri mit Akkumulation von Protoporphyrin in der Leber (83).

HCB führt zu zwei biochemischen Reaktionen, die allerdings wahrscheinlich miteinander verknüpft sind:
so führt HCB zu einer Induktion des Cytochrom P-450-Systems unmittelbar nach Beginn der HCB-Gabe. Dabei handelt es sich um eine sogenannte Mischtyp-Induktion (79); d.h. die gleichzeitige Induktion von Cytochrom P-450 und P-448.

40 bis 60 Tage nach Beginn der HCB-Gabe (in Abhängigkeit von der applizierten HCB-Menge, Tierspezies oder Tierstamm) kommt es zu einer Porphyrie, wobei die Hemmung der Uroporphyrinogen-Decarboxylase (Uro-D) im Vordergrund steht. Es kommt zusätzlich zu einer Vermehrung der Ausscheidung der Porphyrin-Vorstufen, δ-Aminolävulinsäure (ALA) und Porphobilinogen (PBG) im Urin.
Auch ist die Gesamt-Porphyrin-Ausscheidung gesteigert, wobei hochcarboxylierte Uro- und Heptaporphyrine vorherrschen. Ein ähnliches Porphyrinverteilungsmuster läßt sich auch in der Leber nachweisen (47,77).

I.1.3 Klinik und klinisch-chemische Diagnostik

Die Klinik der Porphyrien, insbesondere der PCT ist gekennzeichnet durch charakteristische Hautveränderungen, wobei stecknadelkopf- bis linsengroße, prall mit farbloser Flüssigkeit gefüllte Blasen vorherrschen. Diese Blasen treten an chronisch licht - und mechanisch-belasteten Hautpartien auf: Handrücken, evtl. Unterarme, Unterschenkel bei Frauen und auch im Bereich einer androgenetischen Alopezie. Eine Elastose, eine ausgeprägte Faltenbildung und eine starke Pigmentierung an allen, dem Licht ausgesetzten Hautstellen, sind weitere Leitsymptome der PCT. Darüber hinaus findet man, besonders bei Frauen eine vermehrte Lanugobehaarung und bei Männern eine Zunahme der lateralen Augenbrauen. Außerdem besteht eine leichte Verletzlichkeit der Haut bei schlechter Heilungstendenz. Die Blasen bei der Porphyria cutanea tarda sind subepidermal gelegen, wobei die gesamte Epidermis einschließlich Basalmembran und Basallamina das Blasendach bilden. Deshalb heilen diese Hautveränderungen auch unter Ausbildung von Narben mit Pigmentstörungen und Milien ab (39).

Allerdings kann die klinische Ausprägung der Hautveränderungen individuell erhebliche Unterschiede aufweisen: d.h. bei einigen Patienten herrscht die Elastose vor, bei anderen die Pigmentstörung (Melanodermie-Porphyrie). In anderen Fällen bestimmt die Blasenbildung und Verletzlichkeit der Haut das klinische Bild (29,39).

Bei der Porphyria variegata (PV) liegen vergleichbare Hautveränderungen wie bei der PCT vor, während die Porphyria acuta intermittens (AIP) ohne Hautsymptome verläuft. Die hereditäre Koproporphyrie (HC) hingegen zeigt in ca. 30% der Fälle Hautveränderungen und zwar fast ausschließlcih in Form von Hyperpigmentierungen.

An den inneren Organen finden sich nur in der Leber bei der PCT unterschiedlich stark ausgeprägte Veränderungen, während die übrigen Organe keine PCT-bedingten Veränderungen zeigen.
Besonders charakteristisch ist die typische Rotfluoreszenz des Lebergewebes im UV-Licht. Porphyrine fluoreszieren bei der Belichtung mit UV-Licht intensiv rot, wobei diese Fluoreszenz meist nach Sekunden oder Minuten erlischt. Abgesehen vom klinischen Bild, sowie von den bereits erwähnten spezifischen Porphyrinausscheidungsmustern, gibt es keine für die PCT beweisenden Laborbefunde. In Verbindung mit den zugrundeliegenden Leberschädigungen findet man meist eine leichte Erhöhung der y-GT.
Die Transaminasen sind nur geringfügig erhöht. Nach längerer Zufuhr der Manifestationsfaktoren Alkohol und/oder von Medikamenten kommt es zu einer deutlicheren Erhöhung der y-GT und der Transaminasen (33).

In der Elektrophorese lassen sich häufig vermehrt Immunglobuline, seltener aber eine Albuminverminderung nachweisen. Im Blutbild kommen manchmal Leukozytopenien vor. Bei ca. 50% der Patienten findet sich eine mittlere bis deutliche Erhöhung des Serumeisens, welches mit einer Vermehrung des Serum-Ferritins und einer Verminderung des Transferrins im Plasma einhergeht (29, 30,33,39).

Beweisend für die Diagnose einer PCT ist die erhöhte Porphyrinausscheidung im Urin mit dem charakteristischen Verteilungsmuster:
Vorherrschen von Uro- und Heptaporphyrinen bis zu 80 - 100% der Urinausscheidung der Gesamt-Porphyrine (29)

Abb. 1: Verteilungsmuster der Porphyrinvorstufen und Porphyrinmetabolite bei der Porphyria cutanea tarda (PCT) im Urin, Stuhl und in der Leber

(Zusammenstellung in Anlehnung an DOSS 1961)(29)

	Urin	Stuhl	Leber
ALA (δ-Aminolaevulinsäure)	-	-	-
PBG (Porphobilinogen)	-	-	-
Uroporphyrin	+++	-	+++
Heptaporphyrin	+++	-	+++
Hexaporphyrin	+	-	-
Pentaporphyrin	+	-	-
Koproporphyrin	+	v	-
Triporphyrin	-	-	-
Protoporphyrin	-	v	-
X-Porphyrin	-	-	-
Isokoproporphyrin	-	+++	-

Zeichenerklärung:

- = normal
v = variabel
\+ = erhöht
++ = stark erhöht
+++ = sehr stark erhöht (krankheitsbeweisend)

I.2. Chemie und Biochemie der Porphyrine

I.2.1 Chemische Strukturen

Porphyrine entstehen aus vier Pyrrolringen, die in α- α'-Stellung über Methinbrücken verknüpft sind. Bisher sind etwa 30 biologisch aktive, zyklische Tetrapyrrole vom Typ der Porphyrine bekannt, zu denen neben Haem als wichtigste Verbindung für den Menschen, das Cytohaem der Cytochrome und das Chlorophyl des Blattgrünes gehören (23,39).

I.2.2 Porphyrinbiosynthese

Die Porphyrinbiosynthese verläuft in erster Linie in der Leberzelle und den Erythrozytenvorstufen ab. Der reife Erythrozyt hat die Fähigkeit zur Haemsynthese verloren. In den Mitochondrien erfolgt der erste Schritt der Synthese durch das Schlüsselenzym δ-Aminolävulinsäure-Synthase (E.C.2.3.1.37 = ALA-Synthase).

Durch Kondensation von Succinyl-Coenzym A, Glycin und dem Cofaktor Pyridoxalphosphat entsteht die δ-Aminolävulinsäure (ALA).

Aus zwei Molekülen ALA wird durch die Porphobilinogen-Synthase (E.C.4.2.1.24) das Pyrrolderivat Porphobilinogen (PBG) gebildet (23). Bei diesem Enzym handelt es sich - im Gegensatz zur ALA-Synthase - um ein Cytosol-Enzym, für dessen Funktion Glutathion erforderlich ist. Hier ist zu erwähnen, daß die Porphobilinogen-Synthase durch Blei gehemmt wird und somit die stark erhöhte ALA-Ausscheidung im Urin ein sehr empfindlicher Indikator für eine vorliegende Blei-Intoxikation ist.

Vier Moleküle PBG kondensieren unter Mitwirkung der Enzyme Uroporphyrinogen-I-Synthase (E.C.4.3.1.8.)

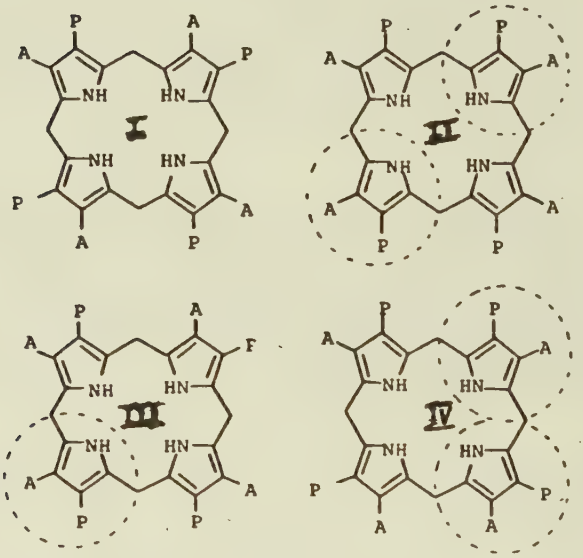
und der Uroporphyrinogen-III-Cosynthase zu Uroporphyrinogen III (22).

Erst 1972 gelang es, Uroporphyrinogen III radioaktiv zu markieren und damit das oder die Enzymsysteme näher zu untersuchen (23). Darüberhinaus wies man 1975 nach, daß das Uroporphyrinogen III auch das Substrat für die Biosynthese des Vitamins B_{12} durch Mikroorganismen ist. Es gilt seitdem als wahrscheinlich, daß sämtliche bisher bekannten zyklischen Tetrapyrrol-Naturstoffe Produkte aus dem Uroporphyrinogen III sind (23).

Insgesamt gibt es vier Isomere Uroporphyrinogene, die mit römischen Ziffern (I,II,III,IV) gekennzeichnet werden. Beim Uroporphyrinogen I stehen alle vier Pyrrolkerne "in Serie", d.h. Essigsäure und Propionsäureseitenkette, gekennzeichnet mit "A" bzw. "P" wechseln regelmäßig ab (23) (siehe Abb. 2).

Abb. 2: Isomere I-IV der Uroporphyrinogene

(Abbildung in Anlehnung an B.FRANCK 1982)(23)

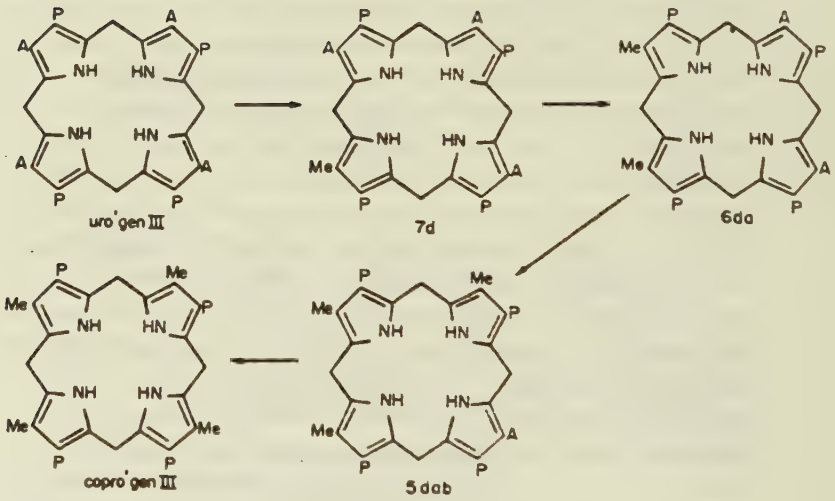


A = CH_2-CO_2H; P = CH_2-CH_2-CO_2H

Bei allen anderen Isomeren ist dagegen jeweils ein Pyrrolring umgedreht. Die verbleibenden Uroporphyrinogene II und IV mit jeweils zwei umgedrehten Pyrrolringen werden im Gegensatz zu den Isomeren I und III nicht in der Natur gefunden.

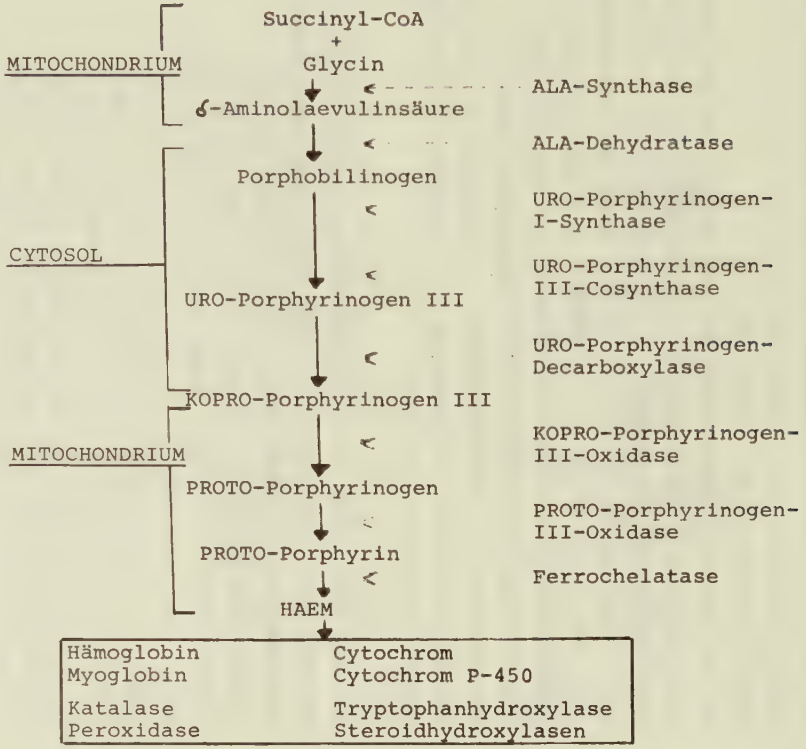
Die vier isomeren Uroporphyrinogene unterscheiden sich praktisch nicht in ihrer Stabilität. Die Zusammensetzung ihres Gleichgewichtsgemisches wird bestimmt durch die Anzahl der zu ihnen führenden Permutationen (23). Dabei überwiegen die Isomere III mit 50% der Gesamtmenge. Somit erhöhen die beteiligten Enzyme lediglich den Anteil eines an sich schon gegenüber seinen Isomeren thermodynamisch bevorzugten Reaktionsproduktes (23). Bei der Haembiosynthese ist somit die Kondensation des Porphobilinogens über offenkettige und zyklische Oligopyrrole von enzymatischen Isomerisierungen von der Inversion einzelner Pyrrolringe begleitet (23). Im weiteren Verlauf der Haembiosynthese entsteht durch schrittweise oxidative Decarboxylierung des Uroporphyrinogen III das Koproporphyrinogen III, welches wiederum in den Mitochondrien durch die Koproporphyrinogen-III-Oxidase (E.C.1.3.3.3.) zu Protoporphyrinogen umgewandelt wird. SMITH (1975) beschrieb die stufenweise Decarboxylierung des Uroporphyrinogen III, wie sie in Abbildung 3 dargestellt ist (23,75,76).

Abb. 3: Stufenweise Decarboxylierung von Uroporphyrinogen III (nach S.G.SMITH et al., 1981) (76)



Die Decarboxylierung beginnt am Ring d (7d) und verläuft über die zweite Decarboxylierung am Ring a (6d a), sowie Ring b (5d a b) zur Decarboxylierung am Ring c, was zur Bildung des Koproporphyrinogen III führt.

Abb. 4: Darstellung der Biosynthese des Haem, der Orte der Synthese sowie der Enzymdefekte. (in Anlehnung an G.GOERZ, 1979) (29)



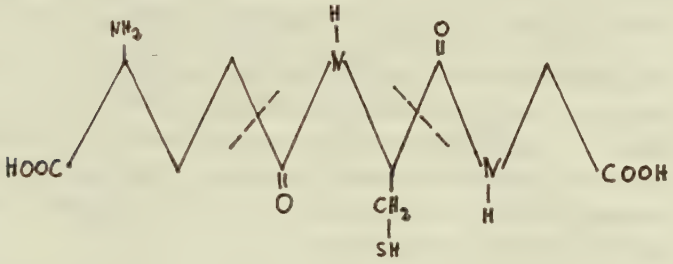
Die bei dieser schrittweise ablaufenden Decarboxylierung benötigte Decarboxylase wird insbesondere bei der häufigsten hepatischen Form der Porphyrien, der PCT, gehemmt. Aufgrund biochemischer Untersuchungen konnte bei der PCT ein Uroporphyrinogen-Decarboxylase-Mangel in der Leber bei allen untersuchten Patienten nachgewiesen werden (ELDER et al. 1978)(20).
In der weiteren Haembiosynthese entsteht durch die Koproporphyrinogen-Oxidase Protoporphyrinogen; das durch die Protoporphyrinogen-Oxidase zu Protoporphyrin und durch den Einbau von Fe^{++} und unter Mitwirkung der Ferrochelatase (E.C.4.99.1.1.) das Endprodukt der Biosynthese - das Haem bildet. Das Haem wird wiederum mit verschiedenen Apoproteinen zu Haem -Protein-Komplexen verknüpft.
Es entstehen so z.B. Hämoglobin und Myoglobin, sowie zahlreiche Oxygenasen, Peroxidasen und Katalasen und die verschiedenen Cytochrome. (91).

Bei der Regulation der Haembiosynthese stellt die ALA-Synthase das limitierende Enzyme dar, wobei eine Haemminderung eine Steigerung - eine Haemvermehrung eine Hemmung der ALA-Synthase bewirkt (36).

I.3. Glutathion (GSH) und seine Beziehungen zur Haembiosynthese

I.3.1 Chemische Struktur

Glutathion (GSH) ist ein Tripeptid und hat die Struktur des y-Glutamyl-Cysteinyl-Glycin:



I.3.2 Schutzfunktion des GSH

GSH besitzt die Fähigkeit mit Hilfe der Glutathion-S-Transferasen die Zelle vor schädigenden Einflüssen durch alkylierende Fremdstoffe zu schützen (BOYLAND und CHASS AUD 1970) (6). Dabei reagiert die SH-Gruppe des Glutathions mit dem elektrophilen Anteil und macht diese Fremdstoffe somit wasserlöslicher. Die dabei entstehenden GSH- Konjugate können dann durch die Glutamat- und Glycinabspaltung metabolisiert und die freie Aminogruppe des Cysteinyl-Restes kann nachfolgend acetyliert werden, wobei als Endprodukt die Mercaptursäure entsteht (6,28).

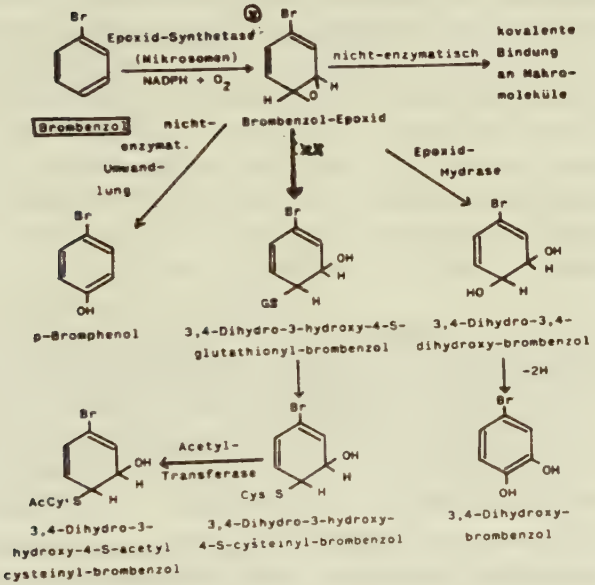
Diese Konjugation einer Reihe von Fremdstoffen und physiologischer Substrate mit Glutathion stellt eine wesentliche Detoxikationsreaktion der Leberzelle dar (64). Primär erfolgt die Konjugation mit der freien SH-Gruppe des Tripeptids.Nachfolgend werden die Glutaminsäure und der Glycinrest des Glutathions abgespalten und die α-Aminogruppe des über eine Thiolethergruppe gebundenen Cysteins durch Acetyl-CoA acetyliert (Lit.s.b. 54).

Besonders deutlich wurde dies von JOLLOW et al. (42) am Beispiel des Brombenzols erarbeitet.
Durch die mikrosomale Epoxid-Synthetase (= Cytochrom P-450) wird das Brombenzol-Epoxid gebildet. Das Epoxid kann nicht-enzymatisch an Makromoleküle der Zelle gebunden oder weiter metabolisiert werden.

Für diese weitere Metabolisierung kommen ein enzymatischer und ein nichtenzymatischer Schritt in Betracht. Nichtenzymatisch wird das Brombenzol-Epoxid in para-Bromphenol umgesetzt. Enzymatisch kann über die GSH-Transferase ein Mercaptursäure-Derivat gebildet werden, welches nachfolgend acetyliert wird. Eine weitere enzymatische Umsetzung kann durch die Epoxid-Hydrase erfolgen. In diesem Reaktionsschritt wird das Brombenzol-Epoxid zuerst in ein Diol und nachfolgend aromatisiert zu Dihydroxy-Brombenzol umgewandelt (28,54)(siehe auch Abb.5).

Abb. 5: Brombenzol-Metabolismus

(nach J.R.GILETTE, 1976) (28)



⊗ = Cytochrom P-450 oder MFO (mischfunktionelle Monooxygenasen)

XX = Umwandlung durch GSH-Transferase

Die Metabolisierung von Arzneimitteln und Fremdstoffen durch die mikrosomalen Cytochrom P-450-abhängigen Isoenzyme erfolgt über verschiedene Rekationsmechnismen.

Eine Form der Metabolisierung ist die Hydroxylierung von Aryl- und Alkylverbindungen, die die Bildung von Epoxiden und Arenoxiden aus aromatischen Verbindungen, speziell aus polycyclischen Kohlenwasserstoffen katalysieren.
Wesentliche Intermediärprodukte, die Epoxide, können einerseits spontan in Alkohole zerfallen, oder andererseits enzymatisch durch die Epoxid-Hydrase in Diole umgewandelt werden. Anschließend können diese Substanzen durch GSH konjugiert und so in wasserlösliche Verbindungen überführt werden (28,34).

GSH schützt außerdem die SH-Gruppen-abhängigen Enzyme der Haembiosynthese, deren katalytische Aktivität von intakten SH-Gruppen abhängt: ALA-Synthase, PBG-Synthase, Ferrochelatase und das haemabbauende Enzym, die Haemoxygenase (E.C.9.10.11.).(GOLDBERG 1959, HAPKE u. PRIGGE 1973, MAINES u. KAPPAS 1977)(35,37,51). Eine indirekte Wirkung dürfte GSH auch auf die Uroporphyrinogen-Decarboxylase haben, da dieses Enzym durch Schwermetalle, wie z.B. Eisen und Blei gehemmt wird. (TALJAARD, SHANLEY u. JOUBERT 1971) (80). Diese Hemmung kann aufgehoben werden, wenn sich GSH und/oder Cystein mit den Schwermetallionen verbindet (MAINES u. KAPPAS 1977). (52).
GSH hat somit eine antioxidative Wirkung und schützt auf diese Weise die Porphyrogene vor der Oxidation durch Schwermetalle oder Sauerstoff zu den biologisch inaktiven Porphyrinen (54).

I.4. Hexachlorbenzol (HCB)

I.4.1 HCB: Fungizid und Auslöser der Porphyria turcica , sowie andere Porphyrogene der experimentellen Porphyrie

Hexachlorbenzol (HCB), ein weltweit bekanntes und angewandtes Fungizid, wurde in den letzten Jahren als Rückstand im Boden, in Pflanzen, Tieren und in menschlichen Geweben gefunden. Insbesondere konnten auch deutliche Mengen in der Muttermilch gefunden werden

I.4.2 Die Türkische Porphyrie 1955

Der Zusammenhang zwischen einer HCB-Ingestion und einer Porphyrinstoffwechselstörung wurde vermutet, als in den Jahren 1955-56 in verschiedenen Provinzen der Türkei eine Endemie hepatischer Porphyrien auftrat (8,9,74).

Als Ursache wurde der Verzehr von HCB behandeltem Saatgetreide angenommen. Im klinischen Erscheinungsbild unterschieden sich die Patienten der "Porphyria turcica" kaum von den PCT-Patienten, wobei ähnlich wie bei der PCT bei den Fällen in der Türkei 1955 der Anteil der männlichen Patienten überwiegt (9).

I.4.3 HCB im Tierversuch

Nach den ersten Veröffentlichungen über die Türkische Porphyrie (CAM und NIGOGOSYAN 1963) (9) kam es weltweit zu Untersuchungen über die molekularbiologische Wirkung des HCB auf den Porphyrin-Stoffwechsel. Dabei konnte gezeigt werden, daß HCB unter anderem auch bei

Ratten und Kaninchen eine Porphyrie erzeugen kann (13,56).

So gilt die HCB-Porphyrie des Kaninchens als das beste tierexperimentelle Modell zum Studium der menschlichen PCT. (DeMATTEIS u. PRIOR u. RIMINGTON 1961, TSCHUDY u. BONKOWSKY 1972) (13,83).

Beim Kaninchen kommt es zu einer erhöhten Gesamtporphyrinausscheidung mit Uro- und Koproporphyrin nach etwa sechs Wochen kontinuierlicher HCB-Applikation, wobei im Gegensatz zur Ratte die Ausscheidung der Porphyrinvorstufen unbeeinflußt bleibt.

I.4.4 Die HCB-induzierte Porphyrie der Ratte

Bei der Ratte führt HCB nach wenigen Tagen zu einer Induktion der mischfunktionellen Monooxygenasen und es kommt, aber erst nach 40-60 Tagen, zu einer Erhöhung der ALA-Synthase.

Im Gegensatz dazu kommt es aber erst nach ungefähr 40-60 Tagen nach Beginn der HCB-Applikation zu einer Porphyrie (31,45,47,56,58,65,77,78).

Charakteristisch ist eine signifikante Steigerung der Ausscheidung der δ-Aminolävulinsäure (ALA), des Porphobilinogen (PBG) und der Porphyrine - vorherrschend Uro- und Heptaporphyrine - im Harn. Zum gleichen Zeitpunkt läßt sich auch ein Abfall des GSH-Gehaltes der Leber feststellen (34,54). Eine gesicherte Erklärung, wie die Induktion des Cytochrom P-450-Systems und die Entstehung der Porphyrie miteinander verknüpft ist, läßt sich noch nicht geben. Ebenso ist noch unklar, warum zunächst die Induktion der P-450-Isoenzyme erfolgt und erst später die Porphyrie auftritt. Es wäre vorstellbar, daß durch die P-450-Induktion das HCB verstärkt und verändert metabolisiert wird, und so ein

spezifisch porphyrogen wirkender HCB-Metabolit entsteht, der zur Manifestation der HCB-Porphyrie führt. Ebenfalls wäre vorstellbar, daß der unter der HCB-Wirkung entstehende GSH-Mangel zu einer derartigen Verschiebung der HCB-Metaboliten führt: Primär kommt es durch die Hemmung der Uroporphyrinogen-Decarboxylase (Uro-D) zu einem Porphyrin-Anstau in der Leber und nachfolgend über einen durch den GSH-Abfall bedingten Mehranfall von Schwermetall-Ionen zur Dekompensation der Haembiosynthese – zur manifesten HCB-Porphyrie (34,79).

I.5. Regelmechanismus der Haembiosynthese im Zusammenhang mit dem Cytochrom P-450-System

I.5.1 δ-Aminolävulinsäure-Synthase als "rate limiting enzyme"

Das Endprodukt Haem reguliert die Aktivität des ersten Enzyms der Haembiosynthese, der δ-Aminolävulinsäure-Synthase. Jeder Mehrbedarf an Haemproteinen bzw. Haemenzymen erfordert eine gesteigerte Synthese des Haem, die nur durch eine Induktion der δ-Aminolävulinsäure-Synthase erfolgen kann. Dabei werden ca 40% des gebildeten Haem in der Leber in das Cytochrom P-450-System eingebaut.

I.5.2 Enzyminduktion und Cytochrom P-450-System

Die Mehrbildung eines haemhaltigen Enzymkomplexes, z.B. des P-450-Systems kann durch zahlreiche Substanzen induziert werden. Als Induktoren des Cytochrom P-450-Systems spielen lipophile Medikamente, besonders Rifampicin, Barbiturate und Hydantoine eine Rolle (10,63). Zahlreiche Xenobiotika, wie aromatische und chlorierte Kohlenwasserstoffe, aber auch physiologische Stoffe (Östrogene, Gestagene, Glucocorticoide und Gallensäuren) werden in der Leber durch dieses Enzym-System metabolisiert. Die meisten dieser lipophilen Substanzen werden

in der Leber durch Einführung einer Hydroxylgruppe und durch nachfolgende Konjugation mit Säuren, wie Glucuron- oder Schwefelsäure so verändert, daß sie über die Nieren mit dem Urin ausgeschieden werden können (12,25,31).

Die Enzyminduktion bedeutet eine Mehrbildung an Enzymproteinen. Das hat so zur Folge, daß bei wiederholter Applikation eines Pharmakons innerhalb eines bestimmten Zeitraumes dieses schneller abgebaut werden kann, sodaß therapeutisch eine nicht mehr ausreichende Konzentration des Pharmakons erreicht wird (FORTH et al. 1975) (22).

Mit der Enzyminduktion kommt es zu einer morphologischen Veränderung der Leberzelle in Form einer Zellvermehrung und Zellvergrößerung (22,24,63).
Elektronenmikroskopisch findet man eine Vermehrung des glatten endoplasmatischen Reticulums, die als morphologisches Äquivalent für die biochemische Anpassungsreaktion der Leber auf das Pharmakon aufzufassen ist.
Es konnte gezeigt werden, daß das Cytochrom P-450-System phylogenetisch sehr alt ist und bereits in Bakterien und Pflanzen vorkommt (23,85). Es findet sich bei Makroorganismen in fast jeder Zelle. Es gibt wahrscheinlich zwischen 7 - 20 Iso-Enzyme des Monooxygenase-Systems, die sich durch ihr Molekulargewicht, ihre Fähigkeit verschiedene Substrate unterschiedlich gut zu metabolisieren und durch ihr Absorptionsmaximum unterscheiden. Aufgrund des unterschiedlichen Molekulargewichtes der Cytochrom P-450-Isoenzyme lassen sie sich mit Hilfe der Elektrophorese in verschiedene Banden auftrennen (25,85,87).

I.5.3 Cytochrom P-450-Isoenzyme

Die verschiedenen Formen lassen sich durch unterschiedliche Substanzen induzieren:
Zwei Formen, das Phenobarbital-induzierte Cytochrom P-450 und das Benzpyren-induzierte Cytochrom P-448 sind

bisher am genauesten untersucht. Das Phenobarbital-induzierte Cytochrom P-450 läßt sich durch Metyrapon hemmen und weist die höchste Aminopyrin-Demethylase-Aktivität auf; während das Benzpyren-induzierte Cytochrom P-448 vorherrschend durch α-Naphthoflavon gehemmt wird. Es wird am besten als Arylhydrocarbon-Hydroxylase-Aktivität gemessen (25).

Wie bereits ausgeführt, werden die verschiedenen Substanzen durch die Monooxygenasen nicht nur entgiftet, sondern sie können, z.B. durch Bildung entsprechender Epoxidstrukturen im Molekül, sogar toxischer werden. Auf diese Weise werden zahlreiche chemische Substanzen erst in die eigentlich wirksame Form überführt. Diese so "gegifteten" (aktivierten) Stoffe, können enzymatisch einmal über die Epoxid-Hydrolasen in entsprechende Diole metabolisiert werden oder durch GSH bzw. die GSH-Transferase konjugiert und so entgiftet werden. Es ist bekannt, daß HCB in der Rattenleber zu zahlreichen S-haltigen Verbindungen metabolisiert werden kann (21,40,44). Diese Umwandlung in S-haltige, unterschiedlich chlorierte Benzol-Derivate /ü.a. erfolgt/durch GSH und die GSH-Transferase. Es konnte gezeigt werden, daß die kontinuierliche Applikation von HCB zu einem Absinken des GSH-Gehaltes in der Leber der Tiere führt; und zwar ungefähr zu dem Zeitpunkt, an dem sich die Porphyrie manifestiert (31,34,47,54,78). Eine Senkung des GSH-Gehaltes der Zelle (z.B. der Leberzelle) könnte in mannigfacher Weise Einfluß auf die Porphyrin- bzw. Haembiosynthese haben. Es sollte deshalb untersucht werden, ob SH-Gruppen tragende Substanzen,z.B. in Form des N-Acetylcysteins in der Lage sind, den GSH-Mangel auszugleichen und die HCB-induzierte Porphyrie der Ratte zu unterdrücken.

I.6. Indikation und Anwendung von N-Acetylcystein (NAC) in der Humanmedizin

N-Acetylcystein ist seit Jahren ein bewährtes Mukolytikum zur Behandlung von Atemwegserkrankungen, die durch dichte und visköse Sekrete gekennzeichnet sind.(1,27,62)

Bei "in vitro" Untersuchungen zeigt NAC eine schnelle Viskositätsminderung des Bronchialschleimes, wobei als Wirkprinzip die Spaltung der Disulfidbrücken (-S-S-) in den Mukoproteinen des Schleimes angenommen wird (2,50,68,89,92).

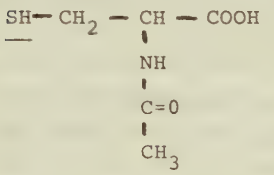
NAC ist als Fluimuzil^{R} in der Schweiz seit dem Jahre 1966 im Handel, wobei es anfänglich nur lokal als Aerosol und zur Inhalation verwendet wurde. Seit etwa 10 Jahren ist es auch als Granulat zur enteralen Verabreichung im Gebrauch.

Seit 1969 ist es als eine 10%ige Lösung für die intramuskuläre Anwendung zugelassen und seit 1971 gibt es Untersuchungen über klinische Erfahrungen mit der Verabreichung von NAC auf intravenösem Wege beim Tier und Menschen.

In der Literatur findet man als Indikation zur NAC-Therapie die chronisch-obstruktive Bronchitis, die cystische Fibrose der Lunge, das Asthma-bronchiale und chronische Erkrankungen der Luftwege bei Kindern.
In Doppelblindversuchen zeigte NAC eine signifikante Verbesserung des klinischen Bildes, wobei die Spaltung der Disulfidbrücken und eine Beeinflussung der Nucleinsäuren durch "Salzbildung" zu einer Depolymerisation der Mukoproteine führt, die dann besser expectoriert werden können (1,2,27,38,51,67,68,89,92).

I.7. Toxikologie, Pharmakokinetik und Metabolismus von N-Acetylcystein

N-Acetylcystein (NAC):



Die Löslichkeit von N-Acetylcystein ist sowohl in Wasser als auch in verschiedenen Puffern besser als die des freien Cystein. Der pH-Wert der Lösungen liegt in Abhängigkeit von der verwendeten Puffer-Lösung zwischen 4,5 und 9,0. Die biologische Wirkung des NAC beruht hauptsächlich auf der freien SH-Gruppe. Das Molekül wird geschützt und stabilisiert durch die Verknüpfung der NH_2-Gruppe mit Essigsäure (Acetat). Untersuchungen von BONANOMI und GAZZANIGA (1980) (5) ergaben, daß NAC durch den Magensaft nicht zersetzt wird. Durch die Intestinalflüssigkeiten dagegen wird NAC oxidiert und zu ca. 16% in dieser Weise metabolisiert. Untersuchungen mit radioaktiv markiertem ^{35}S NAC zeigen, daß NAC rasch verteilt wird und etwa gleichzeitig im Plasma, in der Leber, in den Nieren und in der Lunge nachweisbar ist. Nach ca. 2-3 Stunden wurde die maximale Konzentration in den Organen erreicht (26,49,66,71,72).

I.8. Anwendung von N-Acetylcystein bei der Paracetamol-Vergiftung

Seit dem Jahre 1970 beobachtete man in den angelsächsischen Ländern einen signifikanten Anstieg der Schmerzmittelvergiftungen, wobei vor allen Dingen das Paracetamol oder Acetaminophen (APAP) eine große Bedeutung erlangte (3). Die schwerste Komplikation nach Einnahme der toxischen Menge von APAP ist die Lebernekrose, die von Niereninsuffizienz, Pankreatitis und Myocardschäden begleitet sein kann (41).

Die Hepatotoxizität des APAP oder des Paracetamol beruht auf der Bildung reaktiver nukleophiler Metaboliten, die sich irreversibel an die Leberproteine binden und somit das Parenchym schädigen. Bei Normaldosen wird APAP mit Glutathion konjugiert und so entgiftet. Nach Zufuhr großer Dosen APAP erfolgt eine Erschöpfung des Leber-GSH und dann kann der toxische Metabolit direkt auf das Lebergewebe einwirken (4).

Nachdem die biochemische Grundlage der APAP bzw. Paracetamol-Intoxikation abgeklärt war, wurden mit Erfolg zahlreiche Fälle von Intoxikationen mit Thiolderivaten wie Cystein, Methionin und N-Acetylcystein behandelt (7). Nach den ersten Erfahrungen mit verschiedenen Thiolderivaten wird als therapeutische Alternativlösung das N-Acetylcystein angewandt, das wegen der guten Verträglichkeit des Präparates und der großen Wirksamkeit, als Antidot der ersten Wahl bei der Paracetamol-Vergiftung anzusehen ist (59).

I.9. Problemstellung

Wie bereits oben dargestellt, bewirken bei der HCB-induzierten Porphyrie der Ratte wahrscheinlich und sicher bei der Paracetamol-Intoxikation des Menschen toxische Metaboliten eine Leberparenchymschädigung, wobei eine Reduktion des GSH-Gehaltes der Leberzelle von maßgeblicher Bedeutung ist. Angeregt durch die Therapieerfolge des NAC bei den Paracetamol oder APAP-Intoxikationen sollte untersucht werden, ob NAC auch die HCB-induzierte Porphyrie der Ratte beeinflussen kann.

Es wurde dabei die Entwicklung der Porphyrie untersucht, wobei als Parameter die Ausscheidungsmenge an Porphyrinen und ihrer Metabolite, sowie die Ausscheidungsmenge der Porphyrinvorstufen dienten. Das Schlüsselenzym der Haembiosynthese, die ALA-Synthase wurde in der Leber bestimmt. Außerdem wurde der Einfluß auf das mischfunktionelle Monooxygenasen-System (MFO) durch Messung der Cytochrom P-450 abhängigen Enzym-Aktivitäten - der 7 Aethoxycumarin-Desaethylierung, der Aminopyrin-N-Demethylase - festgestellt. Als weiterer Parameter wurde die Veränderung des Glutathion-Gehaltes in der Leber untersucht.

II. Materialien, Versuchsanordnung und Methoden

II.1. Chemikalien

Acetylaceton p.a.	Fa. Merck/Darmstadt
7-Aethoxycumarin	Fa. Böhringer/Mannheim
Ammoniumacetat p.a.	Fa. Merck/Darmstadt
α-Naphtoflavon (NF)	Fa. Riedel de Haen/NL
Benzpyren	Fa. Ferak/Berlin
Ca Cl_2 p.a.	Fa. Merck/Darmstadt
DL-Isozitronensäure Na$_3$-SALZ $2H_2O$	Fa. Serva/Heidelberg
EDTA	Fa. Serva/Heidelberg
Essigsäure p.a.	Fa. Merck/Darmstadt
Folin-Ciocalteaus Reagenz p.a.	Fa. Merck/Darmstadt
HCL p.a.	Fa. Merck/Darmstadt
Hexachlorbenzol (HCB) 98% z. Synthese	Fa. Merck/Darmstadt
7-Hydroxycumarin (Umbelliferon)	Fa. Merck/Darmstadt
Ionenaustauschersäulen	Fa. Bio Rad/München
Isocitratdehydrogenase (aus Schweineherz)	Fa. Böhringer/Ingelheim
Kationenaustauschersäulen	Fa. Bio Rad/München
Kohlenmonoxid	
Metyrapon (M)	Fa. Ciba-Geigy/Wehr
Mg CL_2 p.a.	Fa. Merck/Darmstadt
N-Acetylcystein (NAC)	Fa. Merck/Darmstadt
$NADP^+$	Fa. Böhringer/Ingelheim
NaOH p.a.	Fa. Merck/Darmstadt
Natriumacetat p.a.	Fa. Merck/Darmstadt
Natriumdithionit	Fa. Merck/Darmstadt
Perchlorsäure p.a.	Fa. Merck/Darmstadt
Pyramidon (Amidopyron)	Fa. Böhringer/Ingelheim
Rinderserumalbumin	Fa. Behring/Marburg
Saccharose p.a.	Fa. Merck/Darmstadt
Trichloressigsäure (TCA) p.a.	Fa. Merck/Darmstadt

II.2. Geräte

Fluoreszens-Photometer PMQ 2, Fa. Zeiss

HPLC Absorbence detector Modell 440, Fa. Waters Corp./USA

HPLC Hochdruckpumpe M 6000 A, Fa. Waters Corp./USA

Kühlzentrifuge JA 20/JA 21, Fa. Beckmann-Instruments/ München

Potentiometerschreiber linear, Fa. Goerz/BBC

Potter-S-Homogenisator nach Elvehjem, Fa. Braun/ Melsungen

Spektralphotometer (Acta C III), Fa. Beckmann-Instruments/München

Spektralphotometer PM 2 D, Fa. Zeiss

II.3. Versuchstiere und Versuchsanordnung

60 weibliche Wistar-Ratten (Zentralinstitut für Versuchstierzucht, Hannover) mit einem Körpergewicht von 180 bis 200 g wurden in vier verschiedenen Versuchsgruppen aufgeteilt. Die Tiere erhielten Standarddiät (Altromin, Lage/Lippe) und hatten freien Zugang zu Wasser und Futter über einen Zeitraum von 10, 20 und 60 Tagen.

Folgende Einteilung der einzelnen Gruppen wurde vorgenommen:

1. Kontrollen (unbehandelte Tiere)
   Diese Tiere erhielten die Standarddiät und hatten freien Zugang zu Futter und Wasser.

2. HCB-Kontrollen
   Die Tiere bekamen während der Versuchsdauer eine 0.05% HCB-haltige Standarddiät.

3. NAC-Kontrollen
   Diesen Tieren wurde während der Versuchsdauer täglich N-Acetylcystein in einer Dosierung von 250 mg pro kg Körpergewicht pro Tag mit Hilfe einer Schlundsonde zugeführt.

4. NAC-HCB-Gruppe
   Diese Tiere erhielten zusätzlich zu einer 0.05% HCB-haltigen Standarddiät eine NAC-Lösung in einer Dosierung von 250 mg pro kg Körpergewicht pro Tag per Schlundsonde.

Nach 10, 20 und 60 Tagen wurden fünf Tiere jeder Versuchsgruppe getötet und die entsprechenden Parameter in den Lebern der Ratten untersucht.

Am Tage zuvor wurden die Tiere in Stoffwechselkäfige zum Sammeln des Urins gebracht, aus dem die Porphyrine und Porphyrinvorstufen bestimmt wurden.

II.4. Methoden

II.4.1. Gewinnung von Lebermikrosomen

Die Lebern der Tiere wurden unmittelbar nach der Tötung entnommen und gewogen. Ein Aliquot von 3 g wurde in eiskalter 0.25 M Saccharose-Lösung gewaschen und anschließend mit 12 ml der gleichen Lösung im Potter-S-Homogenisator unter Eiskühlung homogenisiert. Die erste Zentrifugation wurde bei 2000 g für 5 Minuten in der Kühlzentrifuge bei 4°C durchgeführt. Der Überstand wurde anschließend 20 Minuten bei 10.000 g zentrifugiert.
Die Gewinnung der Mikrosomen erfolgte durch Calcium-Fällung nach der Methode von KAMATH u. RUBIN (1972) (43), wobei der 10.000 g-Überstand auf das 5-fache seines Volumens mit 0.0125 M Saccharose-Puffer, der 8mM $CaCl_2$ enthält, aufgefüllt und anschließend 30 Minuten bei 16.000 g und 4°C zentrifugiert wurde. Der klare Überstand wurde verworfen, und der Niederschlag - die Mikrosomen-Fraktion - mit KCl/Tris-Puffer (4 Teile 0.15 M KCl + 1 Teil 0.25 M Tris-MCL-Puffer, pH 7,5) resuspendiert und homogenisiert. Der Proteingehalt wurde nach LOWRY et al. (1951) bestimmt und die Mikrosomen-Suspension auf 6 mg Protein pro ml eingestellt (48).

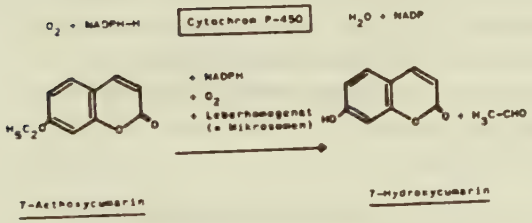
II.4.2. O-Desalkylierung von 7-Aethoxycumarin

(S. auch Abbildung 6: Oxidative Desalkylierung von 7-Aethoxycumarin zu 7-Hydroxycumarin (Umbelliferon)

Die Bestimmung der O-Desalkylierung erfolgte nach der Methode von ULLRICH u. WEBER (1972)(88). Das Prinzip beruht auf der Desalkylierung des nicht fluoreszierenden 7-Aethoxycumarin zum fluoreszierenden 7-Hydroxycumarin (Umbelliferon). In eine 1 ml Küvette mit 1 cm Schichtdicke wurden 0.9 ml Substrat (7-Aethoxycumarin 10^{-3} M) und 0.1 ml Mikrosomensuspension (6 mg Protein/ml) gegeben. Das Gemisch wurde etwa 5 Minuten bei 37^{o} C vorinkubiert und die Reaktion durch Zugabe von 5µl NADPH (3 x 10^{-2}M) gestartet. Die entstehende Fluoreszenz wurde bei einer Anregung von 385 nm und einem Sperrfilter von 420 nm über einen Zeitraum von 2 bis 3 Minuten gemessen. Die Aufzeichnung der Enzymaktivität erfolgte mit Hilfe eines Linearschreibers, wobei die Steigung der Geraden im Vergleich zu der der Eichkonzentration von 7-Hydroxycumarin bestimmt wurde.

Abbildung 6

Umwandlung von 7-Aethoxycumarin zu 7-Hydroxycumarin (= Umbelliferon) unter Einwirkung von Lebermikrosomen, O_2 und NADPH.



7-Aethoxycumarin

7-Hydroxycumarin

II.4.3. Differenzierung der Cytochrom P-450 Isoenzyme durch spezifische Hemmer: Metyrapon und α-Naphthoflavon

Hemmversuche in vitro durch die Inhibitoren Metyrapon (10^{-3}M) und α-Naphthoflavon (5×10^{-6}M) gestatten eine Zuordnung des jeweils vorliegenden Cytochrom P-450-Isoenzyms. Es lassen sich mit Hilfe dieser Inhibitoren zwei Cytochrome unterscheiden:

Einmal das Cytochrom P-448, das Benzpyren-induzierbare Isoenzym, das vorherrschend durch aromatische Kohlenwasserstoffe induziert und durch α-Naphthoflavon gehemmt wird. Molekulargewicht des Cytochrom P-448 ca. 52.000.

Zum anderen das Cytochrom P-450, das Phenobarbital-induzierbare Isoenzym, das überwiegend durch das Metyrapon gehemmt wird. Molekulargewicht des Cytochrom P-450 ca. 46.000.

Die Hemmung erfolgt durch Zugabe von 10µl der jeweiligen Hemmsubstanz zum o.a. Inkubationsansatz.

II.4.4. Bestimmung der Aktivität der Aminopyrin-N-Demethylase (ADM)

Die Bestimmung der ADM-Aktivität erfolgt nach der Methode von SCHOENE et al. (1962) (69).

Testansätze:

1. Probe

1.5 ml KCl/Tris Puffer (pH 7,5)
0.5 ml $MgCl_2$
0.5 ml DL-Na-isocitrat
0.5 ml NaNADP
20µl Isocitratdehydrogenase
0.5 ml Mikrosomensuspension

2. Leerwert

2.0 ml KCl/Tris Puffer
0.5 ml $MgCl_2$
0.5 ml DL-Na-isocitrat
0.5 ml NaNADP
20µl Isocitratdehydrogenase

Die Proben werden 5 Minuten bei 37°C im Schüttelwasserbad vorinkubiert. Der Start der enzymatischen Reaktion erfolgt durch Zugabe von 0,5 ml 0,16 M Pyramidon. Der Abbruch der Reaktion erfolgt nach 7,5 Minuten durch Herauspipettieren von 1,5 ml Inkubationsansatz in vorbereitete Reagenzgläser, die 1,5 ml 7,5%-ige TCA enthalten. Die Leerwerte werden entsprechend behandelt.

Alle Lösungen werden im Anschluß 10 Minuten bei 2.000 g zentrifugiert und 1,5 ml des klaren Überstandes mit 1.5 ml NASH-Reagenz versetzt.

Dieses Gemisch wird für 12 Minuten bei 58°C im Wasserbad inkubiert, und nach Abkühlung auf Zimmertemperatur erfolgt die Messung des entstandenen Farbkomplexes im Photometer bei 412 nm gegen den entsprechenden Leerwert.

II.4.5. Bestimmung der Aktivität der Arylhydrocarbon-hydroxylase (AHH)

Die Bestimmung der AHH erfolgte nach der Methode von DEHNEN et al. (1973) (12). Die Vorinkubation enthielt folgenden Ansatz:

0,7 ml Puffer ph 7,75 (50 mM Tris-HCl, 3 mM $MgCl_2$ und 0.1% Rinderserumalbumin)

0,1 ml $NADP^+$ (1,46 mM im o.a. Puffer)

0,1 ml DL-Isocitrat (16,5 mg/5 ml Puffer)

0,1 ml Mikrosomensuspension (6 mg Protein/ml)

70µl Isocitrat-Dehydrogenase

Der Start erfolgte durch Zugabe von 20µl Benzo(a)pyren-Lösung (5,1 mM in Methanol). Die Inkubation erfolgte bei einer Temperatur von 37° C über 20 Minuten im abgedunkelten Wasserbad.
Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 ml folgender Lösung gestoppt:

90 ml 1 N NaOH
0,1 % EDTA
10 ml Triton x 100

Gemessen wurde die Fluoreszenz des gebildeten 3-Hydroxybenzo(a)pyren bei einer Anregung von 465 nm und einer Emission zwischen 480 und 520 nm.

Als Eichung dienten verschiedene Konzentrationen von 3-Hydroxybenzo(a)pyren-Lösungen.

Die Berechnung erfolgte nach der Formel:

Fluoreszenz in mm bei Range 50

mg Protein/ml x 0,0429 = nMol gebild. 3-OH-Benzo(a)-pyren/mg Protein/20Min.

wobei der Faktor 0,0429 aus der Eichkurve resultierte.

II.4.6. Bestimmung des Cytochrom P-450-Gehaltes

Der Cytochrom P-450-Gehalt wurde in der Mikrosomensuspension durch Messung des CO-Differenz-Spektrums des reduzierten Cytochrom P-450 unter Verwendung des molaren Extinktionskoeffizienten 91 $nM^{-1} \times cm^{-1}$ nach der Methode von OMURA u. SATO (1964) (57) bestimmt. Dabei wurden 2 Ansätze, bestehend aus je 0,5 ml Mikrosomensuspension und 2,5 ml KCl-Tris-Puffer (pH 7,5) als Probe und Leerwert erstellt, sodaß ein Proteingehalt von 1 mg/ml erreicht wurde. Anschließend wurde nur die Probe 20 Sekunden mit CO begast.
Durch Zugabe von $Na_2S_2O_3$ in Probe und Leerwert wurde die Differenz von an CO-gebundenem, reduziertem Cytochrom P-450 und dem reduzierten nicht an CO-gebundenem Cytochrom P-450 zwischen 490 und 450 nm photometrisch gemessen. Anschließend wurde der Cytochrom P-450- Gehalt in nM/mg mikrosomalem Protein berechnet.

II.4.7. Bestimmung des Glutathion-Gehaltes

Die Messung des Glutathion (GSH) erfolgte nach der Methode von RACKER (1951) (60). Das Prinzip besteht darin, daß Glutathion mit Methylglyoxal durch Glyoxalase I (GI-I) (S-Lactoyl-Glutathion-methylglyoxal-lyase EC 4.4.1.5) quantitativ in S-Lactoyl-GSH überführt wird:

$$\text{GSH + Methylglyoxal} \xrightarrow{\text{G I-I}} \text{S-Lactoyl-GHS}$$

Da das in der Leber enthaltene GSH außerordentlich schnell zu GSSG oxidiert wird, wurde auch das oxidierte GSSG nach RALL u. LEHNINGER (1952) (61)

bestimmt, wobei das oxidierte Glutathion durch reduziertes NADPH in Gegenwart von Glutathion-Reductase (GR) (NAD(P)H:oxidiertes Glutathion-Oxidoreduktase, EC 1.6.4.2) quantitativ zu GSH reduziert wird:

$$GSSG + NADPH + H^+ \xrightarrow{GR} 2\ GSH + NADP^+$$

Beide Glutathion-Formen wurden in einem Ansatz bestimmt, wobei zunächst das GSH (Messung der Extinktion bei 240 nm) und anschließend in gleichem Ansatz das GSSG (Extinktion bei 340 nm) gemessen wurde.

II.4.8. Bestimmung der δ-Aminolävulin-Säure-Synthase (ALA-Synthase) in der Leber

Die Bestimmung der ALA-Synthase in der Leber erfolgte durch Modifizierung der Methode nach MARVER et al. (1966) (53), wobei 1g Leber gewaschen und in 3 ml eines Puffers, bestehend aus 0,9% NaCl, 14,62 mg EDTA/100 ml und 121,1 mg Tris/100 ml (Mit Hilfe von HCl auf pH 7,4 eingestellt) homogenisiert wurde.

1 ml des Homogenates ($\hat{=}$ 0,25 g Leber) wurden mit 3 ml Inkubationspuffer (9,76 g Glycin/l, 3,80 g EDTA/l und 12,1 g Tris/l, pH 7,2) versetzt und bei 37° C im Wasserbad unter Lichtabschluß 60 Minuten inkubiert. Die Inkubation wurde mit 1 ml 20%-iger TCA gestoppt. Nach Einstellung auf pH 6,5 mit NaOH wurde der Ansatz 5 Minuten bei 2.000 g zentrifugiert.

Vom Überstand wurden o,5 ml auf eine Kationen-Austauschersäule gegeben und die δ-ALA wurde entsprechend der Methode von DOSS u. SCHMIDT (1971) (16) bestimmt.

II.4.9. Bestimmung der Porphyrine und Porphyrin-Vorstufen: δ-Aminolävulinsäure und Porphobilinogen im Urin

a) Gesamt-Porphyrine

Die quantitative Porphyrinbestimmung im Urin erfolgte nach DOSS (1974) (14), wobei die Porphyrine an Talk gebunden, mit einem Gemisch aus Methanol-Schwefelsäure (95/5; v/v) verestert, in Chloroform ausgeschüttelt und photometrisch zwischen 380 nm und 430 nm das Extinktionsmaximum (Soret-Maximum) gegen einen Leerwert ermittelt und die korrigierte Extinktion berechnet wurde.

b) δ-Aminolävulinsäure (δ-ALA)

Die Bestimmung der δ-ALA erfolgte nach DOSS u. SCHMIDT (1971) (16), wobei in einer Kationenaustauschersäule die δ-ALA absorbiert wird, während Harnstoff und PBG ausgewaschen wurden.
Durch Zugabe von 7 ml 1M Natriumacetat-Puffer pH 6,7 wurde die δ-ALA eluiert. Mit Acetylaceton und anschließendem Einstellen in ein kochendes Wasserbad für 10 Minuten wurde die Ringkondensation der δ-ALA bewirkt, die dann mit 7 ml Ehrlich's Reagenz den Pyrrol-Farbkomplex bildete, der bei 553 nm photometrisch gemessen wird. Aus der erhaltenen Extinktion gegen einen Leerwert, dem Verdünnungsfaktor und dem Urin-Volumen erfolgte

die Berechnung:

$$\delta\text{-ALA } (\mu g/Tier/Tag) = E_{553} \times 60 \times \text{Urin-Volumen.}$$

c) Porphobilinogen (PBG)

Die quantitative Bestimmung des PBG erfolgte nach der Standard-Methode von DOSS u. SCHMIDT (1971) (16), wobei PBG mit Hilfe von Anionenaustauschersäulen aus dem Urin isoliert wird.

0,5 ml Urin werden auf die Säule gebracht, anschließend mit 3 x je 10 ml Aqua dest. gewaschen und das PBG mit 4 ml 1 M Essigsäure eluiert.

Nach Zugabe von 4 ml Ehrlich's Reagenz wird der entstandene Farbkomplex nach 15 Minuten gegen einen Leerwert bei 553 nm photometrisch gemessen.

Berechnung:

$$PBG \ (\mu g/Tier/Tag) = E_{553} \times 88 \times \text{Urin-Volumen.}$$

II.4.10. Bestimmung der Gesamt-Porphyrine in der Leber

Die Bestimmung der Gesamt-Porphyrine in der Leber wurde nach VIZETHUM et al. (1980) (90) bestimmt. Die Lebern wurden im Verhältnis 1:50 in 0,01 M Acetatpuffer (pH 4,5) homogenisiert und anschließend wurde 1 ml des Homogenates auf die Ionenaustauschersäule gegeben.

Die Berechnung erfolgte nach Messung der Extinktion gegen einen Leerwert bei 380 nm und 430 nm, sowie dem Soret-Maximum (E_{max}) nach der Formel:

$$\frac{E_{corr} \times 595 \times \text{Vol (ml HCl)} \times \text{Verdünnung}}{328 \times d \text{ (cm)}}$$

wobei

$$E_{corr} = \frac{2E_{max} - (E_{430} + E_{380})}{k}$$

ist.

328 = Mittl. Extinktionskoeffizient ($mM^{-1}cm^{-1}$)

595 = Mittl. Molekulargewicht der Mischung

k = Mittl. Korrekturdivisor 1,7

d = Schichtdicke

Gesamtporphyringehalt: µg/g Leber

II.4.11. Isolierung, Veresterung und Auftrennung der Porphyrinmetaboliten

Für die Veresterung und Auftrennung der Porphyrine wird eine Endkonzentration von ca. 20µg Porphyrine/ml Urin gewählt, wie bei SEUBERT u. SEUBERT (1982) (70) angegeben. Die entsprechende Menge Urin wird mit ca. 2 g Talk, der mit 1-2 Tropfen Eisessig versetzt worden ist, gemischt. Über eine G-4-Fritte wird abgesaugt und mit Aqua bidest gründlich gewaschen. Die Talkschicht wird mit den adsorbierten Porphyrinen 1 Stunde bei 100° C getrocknet. Nach Zugabe von 10 ml eines Gemisches aus Methanol/Schwefelsäure (9,5/0,5; v/v) ist nach 20 Minuten bei 60° C eine vollständige Veresterung der Porphyrine eingetreten.
Nach Extraktion mit Dichlormethan, Entfernung des Wassers und Filtration wird im Rotationsverdampfer bis zur Trockene abgedampft.
Der Rückstand wird mit soviel Dichlormethan aufgenommen, daß eine Porphyrin-Konzentration von ca. 20µg/ml erreicht wird. Davon werden 5µl in die Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC)-Apparatur injiziert. Mit Hilfe von Vergleichssubstanzen, die aus einem Gemisch sämtlicher Porphyrinmethylester bestehen, erfolgt die jeweilige Zuordnung und durch planimetrische Ausmessung der einzelnen Peaks werden die betreffenden Porphyrinmetaboliten quantitativ bestimmt.

III. Ergebnisse

III.1. Mikrosomales Protein

Der Gehalt an mikrosomalem Protein (Tab.1) in den Lebern zeigt am 10. Tag bei den Kontrollen, bei der NAC-Gruppe und bei den NAC-HCB-Tieren vergleichbare Werte. Bei den HCB-Tieren sind die Werte am 10.Tag signifikant gegenüber den Kontrolltieren, den NAC-Kontrollen sowie den NAC-HCB-Tieren erhöht. Am 20. Tag ergibt sich eine signifikante Erhöhung des Proteingehaltes bei den HCB-Tieren und der NAC-HCB-Gruppe gegenüber den Kontrollen und den NAC-Kontrollen. Eine signifikante Steigerung des Proteingehaltes der HCB-Gruppe ist am 60. Tag noch nachweisbar, wobei die anderen Gruppen eine insgesamt leichte Steigerung zum Vergleich der Werte am 10. Tag bieten. HCB führt somit nach 20 Tagen zu einer signifikanten Steigerung des mikrosomalen Proteins, die nach 60 Tagen noch deutlicher ist. NAC hat nach 20 Tagen keinen Einfluß auf diesen Effekt, hebt jedoch nach 60 Tagen die HCB-Wirkung auf.

Tab. 1

Gehalt an mikrosomalem Protein (mg/g Leber)

	10. Tag[1]	20. Tag[2]	60. Tag[3]
Kontrollen	13,1 ± 1,5*	13,8 ± 0,5	16,7 ± 0,5
NAC-Kontrollen	13,4 ± 0,4	15,5 ± 2,4	17,4 ± 2,3
HCB	17,2 ± 1,5	21,6 ± 2,0	28,4 ± 1,5
NAC-HCB	13,2 ± 0,5	21,5 ± 3,1	16,9 ± 1,5

[1] 10. Tag: HCB-Gruppe signifikant ($p < 0,01$) erhöht gegen alle Gruppen.

[2] 20. Tag: NAC-HCB und HCB-Gruppe signifikant ($p < 0,01$) gegen NAC-Kontrollen und Kontrollen erhöht.

[3] 60. Tag: HCB gegen Kontrollen, NAC-Kontrollen und NAC-HCB signifikant erhöht ($p < 0,01$); vergleichbar dem 10. Tag.

*Die Werte sind Mittelwerte und Standardabweichungen ($\bar{x} \pm s$)

III.2. Beeinflussung der 7-EOC-Deethylase

Die Aktivität der 7-EOC-Deethylase (Tab. 2) ist bei den Kontroll-Gruppen am 10., am 20. und am 60. Tag weitgehend konstant. Die Enzymaktivität bei den NAC-Kontrollen weist nur am 20. Tag eine signifikante Steigerung der Enzymaktivität gegenüber der der Kontrollen auf. Bei den HCB- und NAC-HCB-Gruppen ist bereits am 10.Tag eine deutliche Induktion des Enzyms erkennbar.
Am 20. Tag und am 60. Tag des Versuches bleibt bei der HCB-Gruppe die Steigerung der Enzymaktivität erhalten, während sich bei der NAC-HCB-Gruppe am 20. Versuchstag sogar eine 22-fache Steigerung der Aktivität gegenüber der Kontroll-Gruppe ergibt. Am 60. Tag unterscheidet sich die Enzymaktivität bei der NAC-HCB-Gruppe nicht mehr von den HCB-Kontrollen.

Tab. 2

Aktivität der O-Desalkylierung von 7-Ethoxycumarin
(in nMol Umbelliferon pro Min/mg Protein)

	10. Tag[1]	20. Tag[2]	60. Tag[3]
Kontrollen	0,549 ± 0,021*	0,397 ± 0,006	0,367 ± 0,041
NAC-Kontrollen	0,464 ± 0,042	0,918 ± 0,090	0,668 ± 0,234
HCB	3,030 ± 0,620	4,40 ± 0,75	3,46 ± 1,05
NAC-HCB	3,490 ± 1,250	8,92 ± 2,70	4,70 ± 1,80

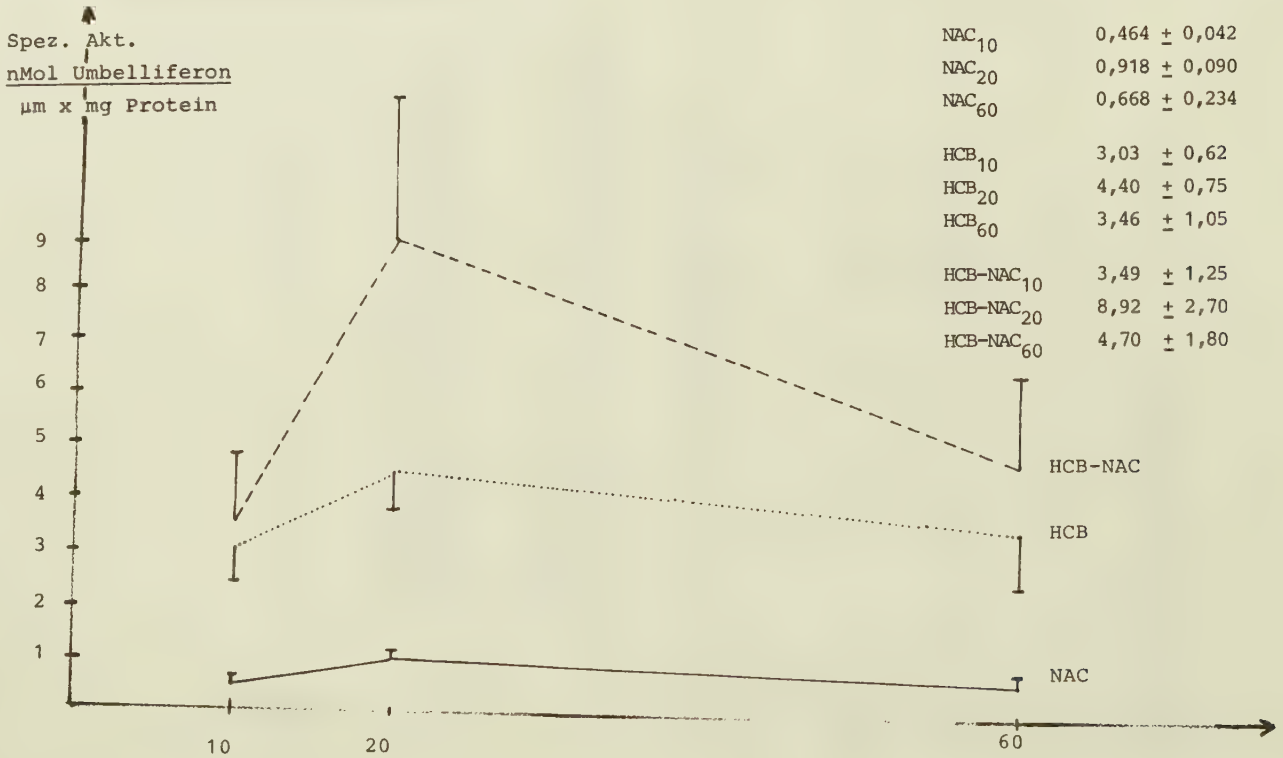
[1] 10. Tag : HCB und NAC-HCB-Gruppe signifikant ($p < 0,01$) gesteigert gegenüber beiden Kontrollen

[2] 20. Tag : HCB und NAC-HCB-Gruppe gegenüber Kontrollen signifikant ($p < 0,01$) gesteigert; NAC-Gruppe gegenüber Kontrollen und auch NAC-HCB-Gruppe gegenüber HCB-Gruppe signifikant ($p < 0,01$) gesteigert.

[3] 60. Tag : HCB und NAC-HCB-Gruppe gegenüber Kontrollen signifikant ($p < 0,01$) erhöht; vergleiche 10. und 20. Tag; außerdem NAC-Gruppe gegenüber Kontrollen signifikant ($p < 0,01$) gesteigert.

* Die Werte sind Mittelwerte mit Standardabweichungen ($\bar{x} \pm s$)

Abb. 7: Graphische Darstellung der Aktivität der O-Desalkylierung von 7-Ethoxycumarin-Deethylase (EOC)



NAC_{10}	0,464 ± 0,042
NAC_{20}	0,918 ± 0,090
NAC_{60}	0,668 ± 0,234
HCB_{10}	3,03 ± 0,62
HCB_{20}	4,40 ± 0,75
HCB_{60}	3,46 ± 1,05
$HCB\text{-}NAC_{10}$	3,49 ± 1,25
$HCB\text{-}NAC_{20}$	8,92 ± 2,70
$HCB\text{-}NAC_{60}$	4,70 ± 1,80

III.3. Differenzierung der P-450-Isoenzyme

Wie bereits ausgeführt, lassen sich zwei Cytochrom P-450 Isoenzyme besonders eindeutig abgrenzen:

1. Cytochrom P-448 Induktor: aromatische Kohlenwasserstoffe
Inhibitor: α-Naphtoflavon (NF)

2. Cytochrom P-450 Induktor: Phenobarbital
Inhibitor: Metyrapone (M)

N-Acetylcystein (NAC) führt während der Versuchsdauer von 60 Tagen zu keiner Verschiebung des Cytochrom P-450-Musters in der Leber, gemessen an der Hemmung der 7-EOC-D durch die Inhibitoren α-Naphtoflavon und Metyrapon in vitro (s. Tab. 3).

Bei den HCB-Kontrollen zeigt sich eine Steigerung der 7-EOC-Deethylase mit einer Zunahme der in vitro-Hemmung sowohl durch Metyrapon als auch durch α-Naphtoflavon; also eine typische Mischtyp-Induktion.

Die HCB-NAC-Gruppe zeigt keinen Unterschied zu den HCB und Kontroll-Gruppen.

Tab. 3

Differenzierung des Cytochrom P-450 durch die unterschiedlichen Hemmer Metyrapon (M) und α-Naphtoflavon (NF)

	10. Tag		20. Tag		60. Tag	
	M	NF	M	NF	M	NF
Kontrollen	10 ± 5*	15 ± 5	5 ± 1	10 ± 3	10 ± 1	11 ± 1
NAC-Kontrollen	7 ± 3	19 ± 7	14 ± 1	17 ± 3	11 ± 3	14 ± 3
HCB	25 ± 4	40 ± 7	22 ± 9	27 ± 7	28 ± 2	41 ± 7
NAC-HCB	25 ± 2	42 ± 4	26 ± 3	31 ± 4	19 ± 5	36 ± 7

*Die Werte sind die prozentuale Hemmung, angegeben als Mittelwerte und Standardabweichungen ($\bar{x} \pm s$)

III.4. Aktivität der Aminopyrin-N-Demethylase (ADM)

Die ADM-Aktivität wird durch HCB induziert, wobei sich ein Maximum nach 20 Tagen HCB-Applikation einstellt, während nach 60 Tagen die Aktivitäten der ADM sich nicht von den Kontrollen unterscheiden (s. Tab. 4).

NAC entweder alleine oder in Kombination mit HCB appliziert, führt zu keiner signifikanten Änderung der ADM-Aktivität.

Tab. 4

Gehalt an Aminopyrin-N-Demethylase (ADM)

(in n Mol gebildetem Formaldehyd pro g Leber pro Min)

	10. Tag[1]	20. Tag[2]	60. Tag[3]
Kontrollen	45,2 ± 6,2*	80,7 ± 8,3	65,6 ± 3,2
NAC-Kontrollen	32,5 ± 4,4	41,8 ± 8,3	91,2 ± 14,9
HCB	87,4 ± 15,2	102,4 ± 19,0	72,0 ± 13,6
NAC-HCB	58,9 ± 9,8	153,0 ± 33,4	71,8 ± 16,9

[1] 10. Tag: HCB und NAC-HCB-Gruppe gegenüber Kontrollen und NAC-Kontrollen signifikant erhöht:
($p < 0,01$) HCB im Vergleich zu Kontrollen
($p < 0,05$) NAC-HCB im Vergleich zu Kontrollen

[2] 20. Tag: HCB und NAC-HCB-Gruppe gegenüber Kontrollen und NAC-Kontrollen signifikant ($p < 0,01$) gesteigert.

[3] 60. Tag: Keine signifikanten Unterschiede innerhalb der vier Gruppen.

* Werte sind Mittelwerte und Standardabweichungen ($\bar{x} \pm s$)

III.5. Aktivität der Arylhydrocarbonhydroxylase (AHH)

Die Arylhydrocarbonhydroxylase (AHH)-Aktivität wird in nMol gebildetem 3-Hydroxy-Benzpyren pro mg eingesetztem Protein pro 20 Minuten gemessen. Wie bereits ausgeführt, kann diese Enzymaktivität zur Bestimmung des Benzpyren-induzierten Cytochrom herangezogen werden.

In der Kontrollgruppe zeigt sich ein Rückgang der Werte am 10. und am 60. Tag (s. Tab. 5). Die NAC-Kontrollen entsprechen der Kontrollgruppe über den gesamten Zeitraum der Versuchsdauer. Bei der HCB-Gruppe zeigt sich bereits am 10. Tag ein signifikanter Anstieg der Werte auf das ca. 10-fache gegenüber der Kontrollgruppe; bei der NAC-HCB-Gruppe ein Anstieg um das ca. 2-3fache. Am 20. Tag finden wir sowohl bei der HCB- als auch bei der NAC-HCB-Gruppe signifikante Steigerungen um das 8-10-fache bzw. das 15-fache gegenüber den Kontroll-Gruppen. Ähnliche Befunde finden sich auch am 60. Tag des Versuches, wobei die alleinige Applikation von NAC oder in Kombination mit HCB auch in diesem Fall zu keiner Änderung der AHH-Aktivität führt.

Tab. 5

Aktivität der Arylhydrocarbonhydroxylase (AHH)
(in nMol gebildetem 3-OH-Benzpyren pro mg Protein pro 20 Min)

	10. Tag[1]	20. Tag[2]	60. Tag[3]
Kontrollen	5,9 ± 0,4	4,2 ± 0,3	1,7 ± 0,2
NAC-Kontrollen	4,5 ± 0,9	3,5 ± 0,4	3,7 ± 2,9
HCB	47,8 ± 3,7	31,9 ± 5,0	29,3 ± 4,1
NAC-HCB	17,6 ± 6,3	61,1 ± 13,6	41,1 ± 6,1

[1] 10. Tag: HCB- und NAC-HCB-Gruppe gegenüber Kontrollen und NAC-Kontrollen signifikant ($p < 0,01$) erhöht.

[2] 20. Tag: Vergleichbarer Befund wie am 10. Tag

[3] 60. Tag: Wie 10. und 20. Tag: HCB- und NAC-HCB-Gruppe gegenüber Kontrollen und NAC-Kontrollen signifikant ($p < 0,01$) gesteigert.

III.6. Cytochrom P-450-Gehalt

Der Cytochrom P-450-Gehalt, gemessen in nMol Cytochrom pro mg Protein wurde nach der Methode von Omura und Sato (1968) (57) bestimmt.
Die Ergebnisse sind in Tabelle 6 zusammengefaßt.
Die Werte der NAC_{10}, NAC_{20} und NAC_{60}-Gruppen unterscheiden sich nicht wesentlich von denen der entsprechenden Kontrollen. Die HCB- und NAC-HCB-Gruppen zeigen bereits am 10. Tag eine signifikante Steigerung gegenüber den Kontrollen und der NAC-Gruppe, ebenso am 20. und 60. Versuchstag. Am 10., 20. und 60. Tag weisen die mit HCB behandelten Gruppen eine Steigerung des Cytochrom P-450-Gehaltes gegenüber der NAC-HCB-Gruppe auf, die jedoch nicht signifikant ist.

Tab. 6

Cytochrom P-450-Gehalt der Leber

(in nMol pro mg mikrosomalem Protein)

	10. Tag[1]	20. Tag[2]	60. Tag[3]
Kontrollen	0,56 ± 0,02*	0,64 ± 0,09	0,62 ± 0,05
NAC-Kontrollen	0,54 ± 0,05	0,69 ± 0,16	0,41 ± 0,13
HCB	1,04 ± 0,20	1,41 ± 0,20	0,99 ± 0,23
NAC-HCB	0,88 ± 0,21	1,26 ± 0,11	0,62 ± 0,12

[1] 10. Tag: HCB- und NAC-HCB-Gruppen gegenüber Kontrollen und NAC-Kontrollen signifikant ($p < 0,01$) gesteigert.

[2] 20. Tag: HCB- und NAC-HCB-Gruppe gegenüber Kontrollen und NAC-Kontrollen signifikant ($p < 0,01$) erhöht.

[3] 60. Tag: Wie 10. und 20. Tag.

* Werte sind Mittelwerte und Standardabweichungen ($\bar{x} \pm s$)

III.7. Gesamt-Glutathion-Gehalt der Leber

Der Glutathion-Gehalt der Leber wurde mit der Methode von RACKER (1971) (60) und von RALL et al. (1968) (61) gemessen und in µMol Gesamt-GSH pro g Leber angegeben. Die Kontrolltiere zeigen gleichbleibende Werte über den gesamten Versuchszeitraum von 60 Tagen hinweg. (s. Tab. 7)

Bei den NAC-Kontrollen ergibt sich nach dem Wert vom 10. Tag, der dem Wert der Kontrolltiere entspricht, eine signifikante Steigerung des GSH-Gehaltes am 20. und am 60. Tag. Diese Werte sind gegenüber den Kontrolltieren um ca. das 2-fache erhöht.

Bei den HCB-Tieren findet man am 10. Tag einen Wert, der den Kontrolltieren entspricht; der aber am 20. Tag signifikant absinkt, wobei sich diese Tendenz bis zum 60. Tag des Versuches fortsetzt.

Bei der Versuchsgruppe,der NAC-HCB-Gruppe, zeigt sich am 10. Versuchstag eine signifikante Steigerung des GSH-Gehaltes auf das 4-fache gegenüber allen anderen Gruppen; dagegen kommt es am 20. Tag zu einem starken Abfall des GSH-Gehaltes auf 6,85 µMol/g Leber. Am 60. Versuchstag sinkt der Wert bei der NAC-HCB-Gruppe sogar auf 2,94 µMol/g Leber ab.

Tab. 7

Gehalt an reduziertem und oxidiertem Glutathion, sowie Gehalt an Gesamt-Glutathion (in µMol pro g Leber)

	Kontrollen	NAC-Kontrollen	HCB	NAC-HCB
10. Tag GSH	3,53 ± 0,21*	4,57 ± 0,12	4,14 ± 0,23	3,13 ± 0,15
GSSG	6,04 ± 0,28	4,63 ± 0,19	6,59 ± 0,54	35,20 ± 1,69
[1]Gesamt	9,57 ± 0,49	9,38 ± 0,31	10,73 ± 0,77	38,33 ± 1,84
20. Tag GSH	1,89 ± 0,18	1,40 ± 0,09	0,67 ± 0,11	1,05 ± 0,03
GSSG	7,13 ± 0,35	24,03 ± 2,10	6,93 ± 0,47	5,80 ± 0,43
[2]Gesamt	10,02 ± 0,58	25,43 ± 2,19	7,60 ± 0,58	6,85 ± 0,46
60. Tag GSH	2,52 ± 0,21	4,06 ± 1,17	2,07 ± 0,10	n.n+
GSSG	8,32 ± 4,64	18,88 ± 2,24	5,08 ± 0,08	2,94 ± 0,06
[3]Gesamt	10,84 ± 4,85	22,94 ± 3,41	7,15 ± 0,18	2,94 ± 0,06

[1] 10. Tag: NAC-HCB-Gruppe signifikant ($p < 0,01$) erhöht gegenüber allen anderen Gruppen

[2] 20. Tag: NAC-Kontrollen signifikant ($p < 0,01$) gesteigert gegenüber allen anderen Gruppen

[3] 60. Tag: NAC-Kontrollen signifikant ($p < 0,01$) gesteigert gegenüber allen anderen Gruppen; NAC-HCB signifikant ($p < 0,01$) gesenkt gegenüber Kontrollen und HCB-Gruppe

*Werte sind Mittelwerte und Standardabweichungen ($\bar{x} \pm s$)

+n.n. = nicht nachweisbar

III.8. Aktivität der δ-Aminolävulinsäure—Synthase (ALA-Synthase) in der Leber

Die Bestimmung der ALA-Synthase in der Leber erfolgte nach einer modifizierten Methode nach MARVER et al. (1966) (53) gemessen in nMol gebildeter ALA pro g Leber pro Std.
Zusammenstallung der Werte s. Tab. 8.

Die Ergebnisse der Kontrolltiere, sowie der NAC-Tiere, zeigen während der gesamten Versuchsdauer vergleichbare Werte. Die HCB-Gruppe zeigt während des 10. und des 20. Untersuchungstages keine Aktivitätssteigerung der ALA-Synthase gegenüber den Kontrolltieren. Am 60. Tag findet sich jedoch eine signifikante Steigerung mit einer 6-7-fachen Erhöhung der Enzymaktivität im Vergleich zu den Kontrollen.

Beide mit HCB-behandelten Gruppen, also die HCB-Kontroll-Gruppe und die NAC-HCB-Gruppe zeigen nach 60 Tagen, also zum Zeitpunkt der Manifestation der Porphyrie, eine hochsignifikante Steigerung der ALA-Synthase, wobei die ALA-Synthase-Aktivität in der NAC-HCB-Gruppe signifikant ($p < 0,05$) niedriger ist. Auch initial, also am 10. und am 20. Tag des Versuches ist NAC in der Lage, die Enzymaktivität der ALA-Synthase, insbesondere in der NAC-HCB-Gruppe, zu senken.

Tab. 8

Aktivität der δ-Aminolävulinsäure-Synthase (ALA-Synthase) in der Leber

(in nMol gebildete ALA pro g Leber pro Stunde)

	10. Tag[1]	20. Tag[2]	60. Tag[3]
Kontrollen	146,4 ± 10,6[+]	146,4 ± 9,1	116,7 ± 13,7
NAC-Kontrollen	123,6 ± 11,8	100,7 ± 12,9	135,0 ± 24,1
HCB	121,3 ± 27,3	160,2 ± 30,3	693,2 ± 38,1
NAC-HCB	100,7 ± 7,5	75,5 ± 11,5	526,2 ± 32,9

[1] 10. Tag: NAC-HCB-Gruppe signifikant ($p < 0,05$) gesenkt gegenüber den anderen Gruppen.

[2] 20. Tag: HCB-Gruppe signifikant ($p < 0,01$) erhöht gegenüber den NAC-Kontrollen und der NAC-HCB-Gruppe.

[3] 60. Tag: HCB- und NAC-HCB-Gruppe hochsignifikant erhöht ($p < 0,01$) gegenüber den Kontrollgruppen; HCB-Gruppe signifikant ($p < 0,01$) erhöht gegenüber NAC-HCB-Gruppe.

[*] Werte sind Mittelwerte und Standardabweichungen ($\bar{x} \pm s$)

III.9. Gesamt-Porphyrin-Gehalt der Leber

Die Bestimmung der Gesamt-Porphyrine in der Leber erfolgte nach der Methode von VIZETHUM et al. (1980) (90) und die Werte werden in µg/g Leber angegeben.

Es ergaben sich innerhalb der Untersuchungsgruppen während des gesamten Versuches keine signifikanten Unterschiede. (s. Tab. 9)

Am 60. Tag zeigte die HCB und die NAC-HCB-Gruppe eine signifikante Steigerung der Gesamt-Porphyrine in der Leber gegenüber den Kontrollen. Diese Befunde zeigen deutlich eine massive Porphyrinablagerung in der Leber in den mit HCB behandelten Gruppen. Die Gabe von NAC beeinflußt in keiner Gruppe den Porphyrin-Gehalt der Leber.

Auffallend ist die große Standardabweichung innerhalb der NAC-HCB-Gruppe am 60 Tag, die sich aus den Einzelwerten der Tiere ergibt.

HCB-NAC-Gruppe: (60. Tag)

n = 1 41,8 µg/g Leber

n = 2 32,8 µg/g Leber

n = 3 228,3 µg/g Leber

n = 4 740,0 µg/g Leber

n = 5 600,1 µg/g Leber

Allerdings liegt auch der niedrigste Wert dieser Gruppe signifikant (zehnfach) über den Werten der Kontrollgruppen.

Tab. 9

Gesamt-Porphyrin-Gehalt der Leber
(gemessen in µg/g Leber)

	10. Tag[1]	20. Tag[2]	60. Tag[3]
Kontrollen	3,92 ± 1,70*	3,70 ± 0,52	4,30 ± 2,04
NAC-Kontrollen	2,30 ± 0,20	1,90 ± 0,41	4,28 ± 1,57
HCB	5,75 ± 2,75	1,90 ± 0,13	307,5 ± 11,0
NAC-HCB	2,10 ± 0,20	2,0 ± 0,60	328,6 ±325,1

[1] 10. Tag: Keine signifikante Steigerung.

[2] 20. Tag: Keine signifikante Steigerung.

[3] 60. Tag: Hochsignifikante Steigerung ($p < 0,01$) der HCB- und NAC-HCB-Gruppe gegenüber den Kontrollen.

*Werte sind Mittelwerte und Standardabweichungen ($\bar{x} \pm s$)

III.10. Gesamt-Porphyrin, δ-Aminolävulinsäure(ALA) und Porphobilinogen (PBG)-Ausscheidung im Urin

Dabei erfolgte die quantitative Porphyrinbestimmung nach DOSS (1974)(14) und die ALA- und PBG-Bestimmung mit Hilfe der Ionenaustausch-Chromatographie nach DOSS und SCHMIDT (1971)(15).

Die Parameter sind zur besseren Übersicht in Tab. 10 nur für den 10., 20. und 60. Tag aufgeführt. Für die Gesamt-Porphyrinausscheidung ergeben sich für alle 4 Gruppen am 10. und am 20. Tag keine signifikanten Unterschiede. Am 60.Tag zeigt die HCB und die NAC-HCB-Gruppe eine massiv gesteigerte Porphyrinausscheidung. In Tab. 11 sind alle gemessenen Werte aufgeführt und es wird deutlich, daß die gesteigerte Porphyrinausscheidung für die HCB und die NAC-HCB-Gruppe am 42. Tag beginnt. Analog sind die Ausscheidungswerte der Porphyrinvorstufenausscheidung im Urin: am 60. Tag sind die Ausscheidungswerte hoch pathologisch und vom 42. Versuchstag an findet sich eine gesteigerte Porphobilinogen- und δ-Aminolävulin-Ausscheidung im Urin der Tiere.

Tab. 10

Gehalt an Gesamt-Porphyrinen, ALA und PBG im Urin

(in µg pro Tier pro Tag)

10. Tag	Gesamt-Porphyrine	ALA	PBG
Kontrollen	7,0 ± 0,8*	33,0 ± 5,5	8,8 ± 3,6
NAC-Kontrollen	2,1 ± 1,6	24,8 ± 12,3	5,5 ± 2,2
HCB	4,6 ± 1,2	21,8 ± 2,9	6,8 ± 3,6
NAC-HCB	7,5 ± 4,5	31,5 ± 12,6	5,5 ± 2,2
20. Tag			
Kontrollen	4,5 ± 1,0	15,0 ± 2,5	14,3 ± 6,6
NAC-Kontrollen	3,6 ± 1,6	24,3 ± 8,5	9,9 ± 4,2
HCB	1,6 ± 0,9	21,8 ± 2,9	8,8 ± 4,0
NAC-HCB	1,6 ± 0,6	22,5 ± 11,6	5,5 ± 2,2
60. Tag[1]			
Kontrollen	4,6 ± 1,2	25,6 ± 2,0	11,0 ± 2,5
NAC-Kontrollen	3,3 ± 0,7	49,5 ± 3,9	8,8 ± 4,4
HCB	73,1 ± 12,6	123,0 ± 31,7	796,4 ± 110,4
NAC-HCB	109,7 ± 31,7	95,3 ± 62,2	886,5 ± 526,1

[1] 60.Tag: Signifikante Erhöhung ($p < 0,01$) der Gesamtporphyrine, der ALA und des PBG bei den HCB- und NAC-HCB-Gruppen gegenüber den Kontrollen.

* Werte sind Mittelwerte und Standardabweichungen ($\bar{x} \pm s$)

jedem 6. Tag

(gemessen in µg Gesamt-Porphyrinen/ALA/PBG pro Tier und pro Tag im Urin)

Gesamt-Porphyrin	6. Tag	12.	18.	24.	30.	36.	42.	48.	54.	60. Tag
Kontrollen	5,0±2,5*	n.b	8,8±3,0	n.b	5,1±3,0	n.b	3,9± 3,5	n.b	2,8± 1,3	4,6± 1,2
NAC-Kontr.	0,9±0,7	2,4±0,9	2,2±1,3	4,3±1,2	1,4±0,3	2,8±1,8	5,2± 1,7	2,1± 1,6	3,4± 0,3	3,3± 0,7
HCB	1,1±0,9	2,6±1,8	1,3±1,4	2,4±1,3	7,4±2,1	9,4±2,2	19,3± 4,0	23,9± 6,6	47,6± 26,4	73,1± 12,6
NAC-HCB	4,4±2,5	4,1±1,7	3,2±2,4	3,0±3,0	2,9±2,3	5,8±2,7	39,9±36,1	21,2±18,2	102,7± 66,7	109,7± 31,7

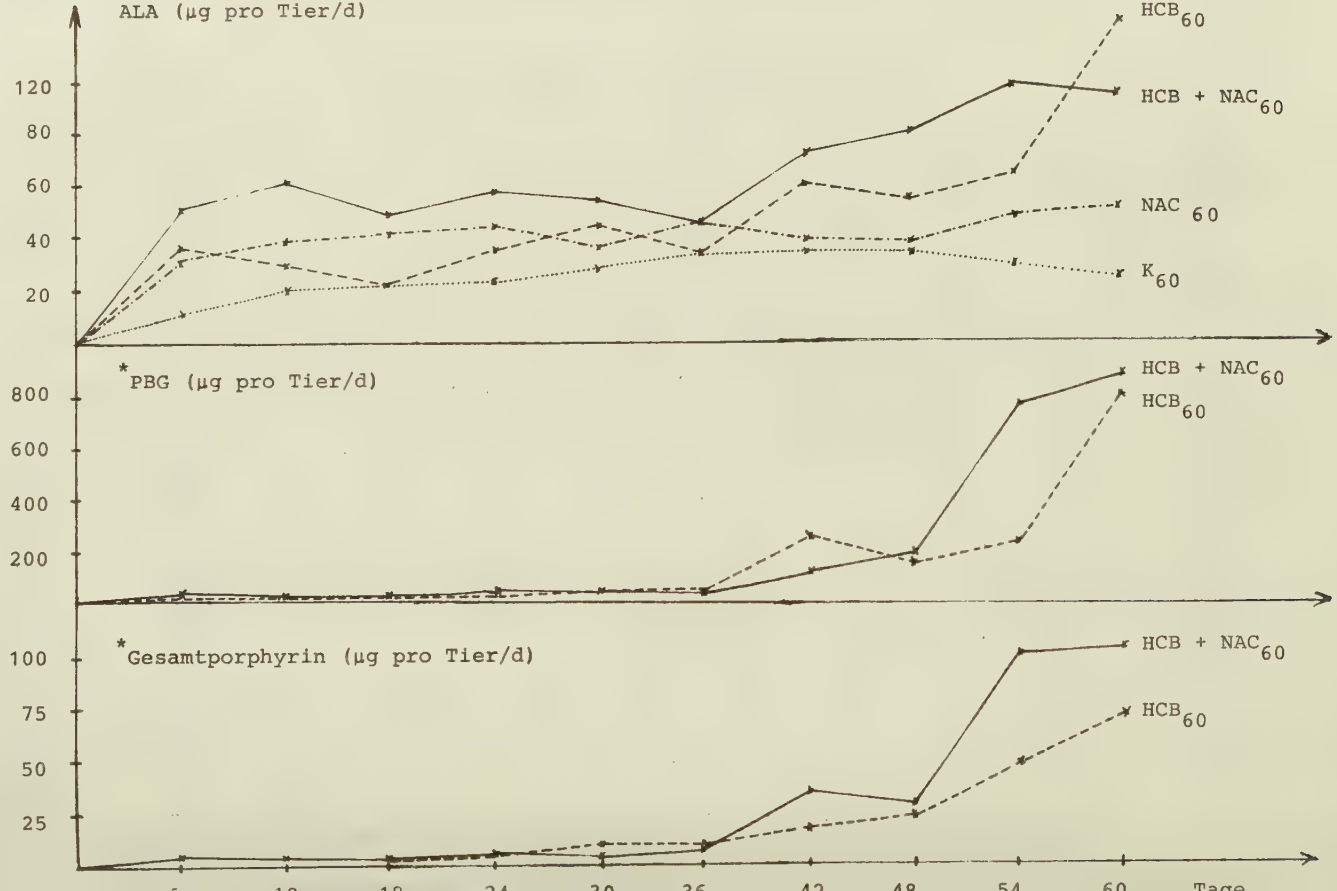
ALA	6. Tag	12.	18.	24.	30.	36.	42.	48.	54.	60. Tag
Kontrollen	20,3± 8,3	n.b.	21,8± 5,1	n.b.	31,5± 3,9	n.b.	27,8± 6,2	n.b.	23,8± 8,3	25,6± 2,0
NAC-Kontr.	31,5± 3,9	39,0± 2,5	48,8± 5,1	42,0± 2,5	36,8± 2,9	42,0± 2,5	37,5±10,5	37,5± 7,1	48,8± 2,9	49,5± 3,9
HCB	37,5±11,0	30,8± 2,9	20,3± 2,1	34,5±14,8	44,3± 3,8	34,5± 5,7	60,0± 4,2	53,3± 6,7	62,3± 10,9	123,0±31,7
NAC-HCB	51,0± 8,8	60,0±12,4	40,0±13,5	36,8± 8,6	35,3±13,5	42,0±16,4	71,3±21,4	79,5±32,5	99,8± 82,4	95,3±62,2

PBG	6. Tag	12.	18.	24.	30.	36.	42.	48.	54.	60. Tag
Kontrollen	11,1± 5,5	n.b.	11,0± 5,7	n.b.	12,1± 6,6	n.b.	12,1± 4,2	n.b.	11,0± 2,5	11,0± 2,5
NAC-Kontr.	6,6± 2,5	5,5± 2,2	5,5± 2,2	6,6± 2,5	8,8± 0	6,6± 2,5	4,4± 0	7,7± 4,2	8,8± 3,6	8,8± 4,4
HCB	9,9± 2,2	11,0± 2,5	11,0± 2,5	12,1± 2,2	20,9± 4,2	20,9± 4,2	228,8±28,5	139,7± 9,8	210,5± 84,8	796,4±110,4
NAC-HCB	8,8± 4,4	12,1± 4,2	11,0± 4,4	16,5± 4,2	7,7± 4,2	6,6± 2,5	101,5±56,2	196,3±143,7	750,0±542,1	886,5±526,1

+n.b. = nicht bestimmt

*Werte sind Mittelwerte und Standardabweichungen ($\bar{x} \pm s$)

Abb. 8 ** ALA, PBG + Gesamt-Porphyrine im Urin der 60-Tage-Versuchstiere in graphischer Darstellung



Anmerkungen zu Tabelle 8

*Kein Kurvenverlauf für K_{60} und NAC_{60}, da alle Werte vom 6.-60. Tag zwischen 0,9 und 8,8 µg

**Aus Gründen der Übersichtlichkeit keine Eintragung der Standardabweichungen; siehe Tabelle 11

III. 11. Verteilungsmuster der Porphyrin-Metaboliten im Urin

Bei allen Kontrolltieren und NAC-Kontrollen findet sich während der gesamten Versuchsdauer keine Verschiebung des Porphyrin-Metaboliten-Musters.

Die Mittelwerte für die beiden Kontrollgruppen vom 6. bis 60. Tag liegen im Normbereich mit

40 - 50 % Protoporphyrin
35 % Koproporphyrin
10 - 20 % Uroporphyrin.

Die Mittelwerte und Standardabweichungen ($\bar{x} \pm s$) der Kontrollgruppe für den 60. Versuchstag in Relativprozent betragen:

41 ± 5	36 ± 10	-	-	9 ± 3	17 ± 5
Proto-	Kopro-	Penta-	Hexa-	Hepta-	Uro- Porphyrin.

Die Mittelwerte und Standardabweichungen ($\bar{x} \pm s$) der NAC-Kontrollen bei einer Versuchsdauer von 60 Tagen in Relativprozent betragen:

45 ± 8	37 ± 11	-	-	6 ± 4	12 ± 6
Proto-	Kopro-	Penta-	Hexa-	Hepta-	Uro-Porphyrin.

Das heißt: es ergeben sich keine signifikanten Unterschiede. Die Werte der HCB- und NAC-HCB-Gruppe sind in Tabelle 12 zusammengetragen. Es zeigt sich, daß mit dem Beginn der gesteigerten Gesamt-Porphyrinausscheidung am 42. Versuchstag gleichzeitig ein sprunghafter Abfall der Protoporphyrinausscheidung einhergeht. Bis zum Versuchsende am 60. Tag findet sich eine Steigerung der hochcarboxylierten Porphyrine (Uro- und Heptaporphyrine) in der HCB- und der NAC-HCB-Gruppe auf ungefähr 50 % der Ausscheidung.

Diese Steigerung der Ausscheidung hochcarboxylierter Porphyrine geht auf Kosten der Protoporphyrinausscheidung.

Tab. 12 Verteilungsmuster der Porphyrinderivate bei der HCB- und NAC-HCB-Gruppe im Urin (Versuchsdauer 60 Tage in Relativprozent)

HCB	Gesamt-porphyrine (µg/ml)	Proto-	Kopro-	Penta-	Hexa-	Hepta-	Uro- Porphyrin (in %)
6.Tag	1,1 ± 0,1	39	34	-	9	10	8
12.Tag	2,6 ± 0,1	32	41	-	4	5	20
18.Tag	1,3 ± 0,1	22	44	-	-	12	23
24.Tag	2,4 ± 0,2	30	37	-	3	12	18
30.Tag	7,4 ± 0,4	34	50	-	-	6	20
36.Tag	9,4 ± 0,6	21	50	-	-	13	16
42.Tag	19,3 ± 1,2	3	50	5	2	9	31
48.Tag	23,9 ± 3,4	-	42	5	10	12	31
54.Tag	47,6 ± 17,3	-	40	-	9	14	37
60.Tag	73,1 ± 13,2	-	35	7	6	13	39

NAC-HCB	Gesamt-porphyrine (µg(ml)	Proto-	Kopro-	Penta-	Hexa-	Hepta-	Uro- Porphyrin (in %)
6.Tag	4,4 ± 0,4	38	34	-	4	10	14
12.Tag	4,1 ± 0,2	40	40	-	2	8	10
18.Tag	3,2 ± 0,8	42	38	-	5	7	8
24.Tag	3,0 ± 0,6	40	35	-	3	7	15
30.Tag	2,9 ± 0,5	45	39	-	-	4	12
36.Tag	5,8 ± 1,2	21	39	-	7	8	25
42.Tag	39,9 ± 3,6	11	45	-	8	5	31
48.Tag	31,2 ± 2,4	9	36	6	8	5	36
54.Tag	102,7 ± 24,3	7	35	6	4	13	35
60.Tag	109,7 ± 18,4	9	31	7	6	12	35

III. 12. Verteilungsmuster der Porphyrin-Metaboliten in der Leber

Entsprechend den Ergebnissen aus dem Urin sind die Verteilungsmuster der Porphyrin-Metaboliten aus den Lebern der Versuchstiere. Hierbei ergeben sich ebenfalls am 10. und am 20. Versuchstag in allen 4 untersuchten Gruppen normale Werte. Die NAC-Gruppe und die reine Kontrollgruppe sind auch am 60. Versuchstag durch Normalwerte gekennzeichnet.

Bei beiden HCB-Gruppen (HCB- und NAC-HCB-Gruppe) ergibt sich ein gesteigerter Gesamt-Porphyringehalt am 60. Versuchstag und ein Vorherrschen der hochcarboxylierten Uro- und Hepta-Porphyrine mit 70 - 80 % des Gesamtgehaltes.
Die Mittelwerte und Standardabweichungen ($\bar{x} \pm s$) sind in Relativprozent in der Tabelle 13 aufgeführt.

Tab. 13 Verteilungsmuster der Porphyrin-Metaboliten in der Leber (in Prozent)

10. Tag	Gesamtporphyrin µg/g Leber	Proto-	Kopro-	Penta-	Hexa-	Hepta-	Uro-
		Porphyrine (in %)					
Kontrollen	3,9 ± 1,7*	42 ± 2	32 ± 7	-	-	14 ± 1	12 ± 6
NAC-Kontr.	2,3 ± 0,2	49 ± 3	38 ± 5	-	-	9 ± 2	4 ± 1
HCB	8,8 ± 2,8	40 ± 2	36 ± 4	-	2 ± 1	3 ± 2	18 ± 1
NAC-HCB	2,1 ± 0,2	41 ± 8	35 ± 3	-	2 ± 1	3 ± 1	20 ± 4
20. Tag							
Kontrollen	3,7 ± 0,5	45 ± 6	38 ± 5	-	-	3 ± 0	12 ± 7
NAC-Kontr.	1,9 ± 0,4	51 ±10	31 ± 6	-	1 ± 1	5 ± 1	13 ± 2
HCB	1,9 ± 2,8	49 ± 3	33 ± 5	-	-	3 ± 1	17 ± 4
NAC-HCB	2,0 ± 0,6	55 ± 3	21 ± 3	-	2 ± 1	3 ± 1	19 ± 1
60. Tag							
Kontrollen	4,3 ± 2,0	52 ± 9	23 ±10	-	-	6 ± 2	19 ± 3
NAC-Kontr.	4,3 ± 1,5	63 ± 6	25 ± 5	-	-	5 ± 5	8 ± 3
HCB	307,5 ±11,0	8 ± 4	15 ± 1	-	-	29 ± 8	48 ±15
NAC-HCB	328,6 ±325,1	13 ±12	6 ± 1	3 ± 1	4 ± 2	28 ± 9	47 ±21

*Werte sind Mittelwerte und Standardabweichungen ($\bar{x} \pm s$)

IV. Diskussion

Die kontinuierliche Exposition von Ratten mit 0,05%-HCB-haltigem Futter führt zu einer Induktion des Cytochrom P-450-Systems am 10. Versuchstag. Nach 50 Tagen kommt es zur Manifestation der HCB-Porphyrie mit signifikanter Erhöhung der Ausscheidung der ALA, PBG und der Gesamt-Porphyrine im Urin. Gleichzeitig findet sich eine signifikante Erhöhung der Porphyrine in der Leber und eine Verschiebung des Ausscheidungsmusters der Porphyrin-Metaboliten mit einem Vorherrschen (70 bis 80%) der hochcarboxylierten Porphyrine: Hepta- und Uroporphyrin. Die Manifestation der HCB-Porphyrie geht dabei mit einem kontinuierlichen Absinken des Glutathion-Gehaltes in der Leber einher. Die gleichbleibend mit NAC gefütterten Tiere - verabreicht als 10%ige N-Acetylcysteinlösung in einer Dosierung von 0,0025 ml pro/g Körpergewicht - zeigten eine Induktion des Cytochrom P-450-Systems am 20. Tag des Versuches; verbunden mit einer signifikanten Steigerung des GSH-Gehaltes zu diesem Zeitpunkt. Es wäre vorstellbar, daß die HCB-induzierte Porphyrie der Ratte, vergleichbar der Paracetamol-Intoxikation des Menschen, durch ein Absinken des GSH-Gehaltes ausgelöst wird, wobei durch Koppelung mit toxischen Metaboliten eine Leberparenchym-Schädigung entsteht.

Die Erfolge bei der Behandlung der Paracetamol-Intoxikation durch N-Acetylcystein (NAC) veranlaßten uns zu den Experimenten, die klären sollten, ob NAC bei der HCB induzierten Porphyrie der Ratte eine protektive Wirkung entfalten kann. Wie die vorgelegten Befunde zeigen, kommt es bei gleichzeitiger Gabe von Hexachlorbenzol und N-Acetylcystein zu einer manifesten HCB-Porphyrie um den 54. Tag, also

zu dem gleichen Zeitpunkt wie bei den nur mit HCB gefütterten Tieren.

Die gemessenen Parameter im Urin und in der Leber wiesen bei der NAC-HCB-Gruppe außerordentlich große Schwankungen auf. Während 3 Tiere das Vollbild der HCB-Porphyrie aufweisen: z.B. 100 - 200-fach gesteigerte Ausscheidung der Gesamtporphyrine, zeigen die restlichen 2 Tiere nur eine 2 - 10-fache Steigerung. Allerdings liegen auch diese Werte außerhalb der Grenzen der Normalwerte für die Porphyrinausscheidung im Urin von Wistar-Ratten. Es läßt sich also in der NAC-HCB-Gruppe keine protektive Wirkung des NAC auf die durch HCB induzierte Porphyrie der Ratte nachweisen. Wie die Ergebnisse zeigen, ergibt sich in der NAC-HCB-Gruppe gegenüber der reinen HCB-Gruppe keine signifikante Steigerung des GSH-Gehaltes. Dies erklärt wahrscheinlich das Fehlen einer protektiven Wirkung auf die HCB- induzierte Porphyrie der Ratte.

Wir müssen also annehmen, daß HCB eine Veränderung an der Leberzelle bewirkt, die es unmöglich macht, exogen zugeführte Thiole,z.B. N-Acetylcystein zu binden, wie dies die normale Leberzelle (N-Acetylcystein-Kontrollgruppen) vermag. Wenn wir unterstellen, daß SH-Gruppen-Donatoren in der Leber eine HCB induzierte Porphyrie verhindern, ist das bei dem tierexperimentellen Modell der HCB-Porphyrie der Ratte durch exogene Zufuhr der Thiole in Form von N-Acetylcystein nicht möglich.

Nach unterschiedlicher Versuchsdauer (10, 20 und 60 Tage) wurden bei den Tieren Porphyrine und Porphyrinvorstufen im Urin, sowie aus dem Aliquot der Leber die δ-Aminolävulinsäure-Synthase, das Cytochrom P-450 - und abhängige Enzymaktivitäten - sowie der Glutathiongehalt bestimmt.
Es konnte gezeigt werden, daß die N-Acetylcystein-Zufuhr weder die HCB bedingte GSH-Erniedrigung, die HCB bedingte P-450 Isoenzym-Induktion, noch die HCB bedingte hepatische Porphyrie verhindern kann.

V. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden weibliche Wistar-Ratten in 4 verschiedene Versuchsgruppen aufgeteilt. Alle Tiere erhielten Standarddiät und hatten freien Zugang zu Wasser und Futter über einen Zeitraum von 10, 20 und/oder 60 Tagen.

Die HCB-Kontrollen erhielten während der Versuchsdauer eine 0,05%ige HCB-haltige Standarddiät.

Die N-Acetylcystein-Kontrollen erhielten während des Versuches täglich N-Acetylcystein in einer Dosierung von 250 mg/kg Körpergewicht und Tag mit Hilfe einer Schlundsonde. Die eigentliche Versuchsgruppe, die NAC-HCB-Gruppe erhielt sowohl eine 0,05%ige HCB-Standarddiät als auch eine NAC-Lösung in einer Dosierung von 250 mg pro kg Körpergewicht und Tag per Schlundsonde. N-Acetylcystein (NAC) gilt als Antidot bei der Paracetamol-Vergiftung und führt als SH-Gruppen-Donator zu einer Steigerung des Glutathion-Gehaltes in der Leber, wobei Paracetamol mit Glutathion konjugiert und so entgiftet wird.

Das Hexachlorbenzol (HCB) entfaltet bei der HCB-induzierten Porphyrie der Ratte eine ähnliche lebertoxische Wirkung mit Erniedrigung des GSH-Gehaltes. Die Problemstellung der Arbeit war: Kann N-Acetylcystein eine Leberschutzwirkung mit Erhöhung des Glutathions bewirken und so vielleicht die HCB-induzierte Porphyrie der Ratte verhindern.

VI. Abkürzungen

AIA	Allylisopropylacetamid
AIP	Porphyria acuta intermittens
ALA	δ-Aminolävulinsäure
ALA-Synthase	δ-Aminolävulinsäure-Synthase
APAP	Paracetamol, Acetaminophen
CEP	Congenitale erythropoetische Porphyrie
DDC	Diäthyl-1,4-dihydro-2,4,6-Trimethylpyridine, 3,5 dicarboxylat
EPP	Erythropoetische Protoporphyrie
GOT	Glutamat-Oxalat-Transaminase
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase
GSH	Glutathion
GSSG	reduziertes Glutathion
HCB	Hexachlorbenzol
LDH	Lactat-Dehydrogenase
M	Metyrapon
NAC	N-Acetylcystein
NF	α-Naphthoflavon
PBG	Porphobilinogen
PCT	Porphyria cutanea tarda
PV	Porphyria variegata
PVC	Polyvenylchlorid
SDH	Sorbit-Dehydrogenase

VII. Literatur

1. AYLWARD,M., MADDOCK,J., DEWLAND,P. (1980)
Clinical Evaluation of Acetylcysteine in the Treatment of Patients with Chronic Obstructive Bronchitis: a Doubleblind Trial with Placebo Control.
Europ. J. of Respir. Diseases 111, 81-89

2. BARAN,D. (1980)
Mucolytic Treatment in Cystic Fibrosis. Double-blind Clinical Trial with Oral Acetylcysteine and Placebo.
Europ. J. of Respir. Diseases 111, 134-135

3. BARKER,J.D., de CHARLE,D.J., ANURAS,S. (1977)
Chronic Exersive Acetaminophen Use and Liver Damage.
Ann. Int. Med. 87, 299-301

4. BLACK, M. (1980)
Acetaminophen Hepatotoxicity.
Gastroenterology 78, 382-392

5. BONANOMI,L., GAZZANIGA,A. (1980)
Toxicological, Pharmacokinetic and Metabolic Studies on Acetylcysteine.
Europ. J. of Respir. Diseases 111, 45-51

6. BOYLAND,E., CHASSAUD,L.F. (1970)
The Effect of Some Carbonyl Compounds on Rat Liver Glutathione Levels.
Biochem. Pharmacol. 19, 1526-1528

7. BRODIE,B.B., AXELROD,J. (1949)
The Fate of Acetophenetidin (Phenacetin) in Man and Methods for the Estimation of Acetophenetidin and its Metabolits in Biological Material.
J. Pharmacol. Exp. Ther. 97, 58-67

8. CAM,C. (1959)
Cutaneous Porphyria Related to Intoxication.
Dirim (Istanbul) 34, 11-14

9. CAM,C., NIGOGOSYAN,G. (1963)
Acquired Toxic Porphyria Cutanea Tarda Due to Hexachlorobenzene.
J. Amer. Med. Ass. 183, 88-91

10. CONNEY,A.H. (1967)
Pharmacological Implications of Microsomal Enzyme Induction.
Pharmacol. Rev. 19, 317-366

11. DALTEN,D.R. (1979)
The Alkaloids, a Biogenetic Approach (Ed.)
Marcel Dekker, New York

12. DEHNEN,W., TOMINGAS,R. ROOS,J.(1973)
A Modified Method for the Assay of Benzo(a)pyrene Hydroxylase.
Anal. Biochemistry 53, 373-383

13. De MATTEIS,F., PRIOR,B.E., RIMINGTON,C. (1961)
Nervous and Biochemical Disturbances following Hexachlorobenzene Intoxication.
Nature 191, 363-366

14. DOSS,M. (1974)
Porphyrins and Porphyrin Precursors
Clinical Biochemistry, Principle and Methods,
Vol. II, 1323-1371, H.Ch.CURTIUS, ROTH,M. (Eds)
Verlag de Gruyter, Berlin

15. DOSS,M., MEINHOFF,W. (1972)
Differenzierung hepatischer Porphyrinurien.
Dtsch. Med. Wschr. 96, 1007-1012

16. DOSS, M., SCHMIDT, A. (1971)
Quantitative Bestimmung von 5-Aminolaevulinsäure und Porphobilinogen im Urin mit Ionenaustauscher-chromatographie-Fertigsäulen.
Z. klin. Chem. u. klin. Biochem. Jg. 9, 99-102

17. DOSS,M., SCHMIDT,A. (1971)
Rapid Determination of Urinary Total Porphyrins by Ion Exchange Chromatography.
Z. klin. Chem. u. klin. Biochem. Jg. 9, 415-420

18. DOSS,M., v.TIEPERMANN,R., SCHNEIDER,J. (1980)
Acute Hepatic Porphyria Syndrome with Porphobilinogen Synthase Defect.
Int. J. Biochem. 2, 823-826

19. DRILLER, K. (1978)
Glucarolacton-Ausscheidung bei der Porphyria cutanea tarda. Dissertation, Düsseldorf

20. ELDER,G.H., PATH,H.R.C., LEE,G.E., TOVEY,J.A. (1978)
Decreased Activity of Hepatic Uroporphyrinogen-Decarboxylase in Sporadic Porphyria Cutanea Tarda.
New Engl. J. Med. 299, 274-278

21. ENGST,R., MACHOLZ,R.M., KUJAWA,M. (1976)
The Metabolism of Hexachlorobenzene (HCB) in Rats.
Bull. Environ. Contam. Toxicol. 16, Vol. 2,
Springer Verlag, New York

22. FORTH, W., HENSCHLER, D., RUMMEL,W. (1975)
Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie.
Wissenschaftsverlag, Bibliographisches Institut,
Mannheim-Wien-Zürich

23. FRANCK,B. (1982)
Aktuelle Probleme der Biosynthese des roten Blutfarbstoffes. Angew. Chemie 94, 327-337

24. FRANKLIN,M.R. (1977)
Inhibitation of Mixed-Function Oxidations by Substrates Forming Reduced Cytochrome P-450 Metabolic-Intermediate Complexes.
Pharmacol. Ther. A. 2, 227-245

25. FUCHS,W. (1978)
Induktion des Cytochrom P-450-Systems der experimentellen Hexachlorbenzol-Porphyrie unter besonderer Berücksichtigung der Geschlechtsunterschiede.
Dissertation, Düsseldorf

26. GAZZANIGA,A., BORGOGELLI,E., GGIULIDORI,P., MANZONI,P., MARTINETTI,M., MILAN,C. (1975)
Pharmacokinetics and Metabolism of S^{35} Labelled N-Acetylcysteine; Part 1&2.
Unpublished Report prepared by ZAMBON S.p.A. Research Labortoires Bresso, Milan, Italy

27. GERMOUTY,J., BROCARD,H., CHARPIN,J. (1980)
Kooperative Doppelblindstudie mit oralem Acetylcystein und Placebo.
Therapiewoche 30, 1984-1990

28. GILETTE, J.R. (1976)
Environmental Factors in Drug Metabolism.
Fed. Proc. 35, 1142-1147

29. GOERZ, G. (1979)
Porphyrinkrankheiten - Hepatische Porphyrien.
Dermatologie in Praxis und Klinik, Band III,
Günter W. KORTING (Ed.), G. Thieme Verlag, Stuttgart

30. GOERZ, G. (1979)
Klinik und Therapie der Porphyria cutanea tarda.
Dermatologica 159, 393-399

31. GOERZ,G., KRIEG,Th., BOLSEN,K., LISSNER,R. (1977)
Langzeit-Exposition von Ratten mit Hexachlorbenzol(HCB) Einfluß auf die Porphyrin-Ausscheidung im Urin und auf das Cytochrom P-450 in der Leber.
Arch. Derm. Res. 259, 199-206

32. GOERZ,G., MERK.H. (1982)
Fortschritte in der Dermatologie: Neue biochemische Aspekte.
Fortschr. der Med. 100, 1467-1471

33. GOERZ,G., STROHMEYER,G. (1983)
Porphyria cutanea tarda.
Internist 24, 543-549

34. GOERZ,G., VIZETHUM,W., LISSNER,R. (1979)
Verhalten des hepatischen Glutathion(GSH) bei der Ratte unter kontinuierlicher Hexachlorbenzol(HCB)-Gabe.
Dermatosen in Beruf und Umwelt 27, 173-175

35. GOLDBERG,A. (1959)
The Enzymatic Formation of Heme by the Incorporation of Iron into Protoporphyrin; Importance of Ascorbic Acid, Ergothioneine and Glutathione.
Brit. J. Haemat. 5, 150-157

36. GRANICK,S., KAPPAS,A. (1967)
Steroid Induction of Porphyrine Synthesis in Liver Cell Culture.
J. Biol. Chem. 242, 4587-4593

37. HAPKE,H.-J., PRIGGE,E. (1973)
Interaction of Lead and Glutathione with δ-Aminolevulinic Acid Dehydrogenase.
Arch. Toxicol. 31, 153-161

38. HOFMANN,A. (1980)
Orale Anwendung von Acetylcysteine bei der Behandlung von Asthma bronchiale und chronischen Erkrankungen der Luftwege.
Therapiewoche 30, 2040-2046

39. IPPEN,H. (1972)
Die Porphyrin-Krankheiten.
In: Klinik der Gegenwart 6, 209-221 (Ed.)
Verlag Urban & Schwarzenbach, München-Berlin-Wien

40. JANSON,B., BERGMANN, A. (1978)
Sulphur-Containing Derivates of Hexachlorobenzene(HCB)-Metabolits in the Rat.
Chemosphere 8, 257-268

41. JOHNSON,G.K., TOLMAN,K.G. (1977)
Chronic Liver Disease and Acetaminophen.
Ann. Int. Med. 87, 302-304

42. JOLLOW,D.J., MITCHELL,J.H., ZAMPAGLIONE,N., GILETTE,J.R. (1974)
Bromobenzene-Induced Liver Necrosis. Protective Role of Glutathione and Evidence for 3.4-Bromobenzene Oxide as the Hepatotoxic Metabolite.
Pharmacology 11, 151-169

43. KAMATH,S.A., RUBIN,E. (1972)
Interaction of Calcium with Microsomes: A modified Method for the Rapid Isolation of Rat Liver Microsomes.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 49, 52-59

44. KOSS,G., KORANSKY,W., STEINBACH,K. (1976)
Studies on the Toxicology of Hexachlorobenzene. II. Identification and Determination of Metabolits.
Arch. Toxicol. 35, 107-114

45. KRIEG,Th., BOLSEN,K., GOERZ,G., LISSNER,R., ULLRICH,V. (1977)
O-Dealkylative Activity in Rat Liver Following Application of Hexachlorobenzene.
Arch.Derm. Res. 258, 109-110

46. KUSHNER,J.P., LEE,G.R., NACHT,S. (1972)
The Role of Iron in the Pathogenesis of Porphyria Cutanea Tarda. An in Vitro Model.
J. Clin. Invest. 51, 3044-3050

47. LISSNER, R., GOERZ,G., EICHENAUER,M., IPPEN,H. (1975)
Hexachlorobenzene-Induced Porphyria in Rats. Relationship between Porphyrin Excretion and Induction of Drug Metabolizing Liver Enzymes.
Biochem. Pharmacol. 24, 1729-1731

48. LOWRY,O.H., ROSEBROUGH,N.J., FARR,A.L., RANDALL,R.S. (1951)
Protein Measurement with Folin Phenol Reagent.
J. Biol. Chem. 193, 265-275

49. MADDOCK,J. (1980)
Biological Properties of Acetylcysteine: Assay Development and Pharmacokinetic Studies.
Europ. J. of Respir. Diseases 111, 52-59

50. MAESEN,F., BROMBACHER,P. (1980)
Die Behandlung der chronischen Bronchitis mit oralen Dosen von Acetylcystein.
Therapiewoche 30, 2024-2027

51. MAINES,M.D., KAPPAS,A. (1977)
Metals as Regulator of Heme Metabolism.
Science 198, 1215-1221

52. MAINES,M.D., KAPPAS,A. (1977)
Regulation of Heme Pathway and Cellular Glutathione Content by Metals that do not Chelate with Tetrapyrroles: Blockade of Metal Effects by Thiols.
Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 74, 1875-1878

53. MARVER,H.S., TSCHUDY,D.P., PERLROTH,M.G., COLLINS,A. (1966)
δ-Aminolaevulinic Acid Synthase.
I. Studies in Liver Homogenates.
J. Biol. Chem. 241, 2803-2809

54. MEUTER,U.P. (1980)
Die Bedeutung des hepatischen Glutathions für die Hexachlorbenzol-induzierte Porphyrie der Ratte.
Dissertation, Düsseldorf

55. MITCHELL,J.R., THORGEIRSSON,S.S., POTTER,W.Z. (1974)
Acetaminophene-Induced Hepatic Injury: Protective Role of Glutathione in Man and Rationale for Therapy.
Clin. Pharmacol. Ther. 16, 676-684

56. OCKNER,R.K., SCHMID,R. (1961)
Acquired Porphyria in Man and Rat due to Hexachlorobenzene Intoxication.
Nature 189, 449-450

57. OMURA,T., SATO,R. (1964)
The Carbon Monoxide-binding Pigment of Liver Microsomes.
J. Biol. Chem. 239, 2370-2378

58. PEARSON,R.W., MALKINSON,F.D. (1965)
Some Observations on Hexachlorobenzene Induced Experimental Porphyria.
J. Invest. Derm. 44, 420-432

59. PRESCOTT,L.F. (1979)
N-Acetylcystein als Antidot bei Paracetamol-Vergiftungen beim Menschen.
Unpublished Report prepared by Zambon S.p.A. Research Labortoires Bresso, Milan, Italy

60. RACKER,E. (1951)
The Mechanisme of Action of Glyoxalase.
J. Biol. Chem. 190, 685-696

61. RALL,T.W., LEHNINGER, A.L. (1952)
Glutathione Reductase of Animal Tissues.
J. Biol. Chem. 194, 119-130

62. REIMANN,B. (1980)
Klinischer Doppelblindversuch mit Acetylcystein, S-(Carboxymethyl)-L-Cystein-Natrium und Placebo bei chronischer Bronchitis.
Therapiewoche 30, 1978-1983

63. REMMER,H. (1972)
Induction of Drug Metabolizing Enzyme System in the Liver.
Europ. J. Clin. Pharmacol. 5, 116-136

64. RENNER,G., HERFORTH,B., GOKEL,J.M., GOERZ,G., LUDERSCHMIDT,C. (1981)
Subchronic Toxicity Studies on Pentachloro-nitrosobenzene (PCNO) in Female Rats.
Ecotoxicology and Environmental Safety 5, 281-290

65. RIMINGTON,C., ZIEGLER,G. (1963)
Experimental Porphyria in Rats Induced by Chlorinated Benzenes.
Biochem. Pharmacol. 12, 1387-1397

66. RODENSTEIN,D., De COSTER,A., GAZZANIGA,A.(1980)
Pharmacokinetics of Oral Acetylcysteine: Absorption, Binding and Metabolism in Patients with Respiratory Disorders.
Europ. J. of Respir. Diseases 111, 59-61

67. RUDNIK,J., GAWEL,J., HALUSZKA,J., KURZAWA,R., MIELNICKA,B., MAJEWSKA-ZALEWSKA,H., ZIELEN,B., ZEBRAK,J. (1980)
Oral Acetylcysteine Treatment in Children with Chronic Lung Diseases.
Europ. J. of Respir. Diseases 111, 140-141

68. SARAIVA,P.A.P., GIOVANI,L., GIORDAN,E.A., LEITAO,F.B.P. (1980)
Long-Term Use of Oral Acetylcysteine.
Europ. J. of Respir. Diseases 111,113-114

69. SCHOENE,B., FLEISCHMANN,R.A., REMMER,H., v.OLDERSHAUSEN,H.F. (1972)
Determination of Drug Metabolizing Enzymes in Needle Biopsies of Human Liver.
Europ. J. clin. Pharmacol. 4, 65-73

70. SEUBERT,A., SEUBERT,S. (1982)
High-Performance Liquid Chromatographic Analysis of Porphyrins and Their Isomers with Radial Compression Columns.
Anal. Biochem. 124, 303-307

71. SHEFFNER,A. (1963)
The Reduction in Vitro in Viscosity of Mucoprotein Solution by a New Mucolytic Agent: N-Acetylcysteine.
Ann. of the New York Acad. of Science 106, 298-310

72. SHEFFNER,A., MEDLER,E.M., BAILEY,K.R., GALLO,D.G., MÜLLER,A.J., GARETT,H.P. (1966)
Metabolic Studies with Acetylcysteine.
Biochem. Pharmacol. 15, 1523-1535

73. SIMON,N., SIKLOSI,C. (1974)
Beeinflussung des Porphyrinstoffwechsels durch Umweltfaktoren.
Berufsdermatosen 22, 237-259

74. SCHMID,R. (1960)
Cutaneous Porphyria in Turkey.
New Engl. Med. 263, 397-398

75. SMITH,K.M. (1975)
Porphyrins and Metallporphyrins (Ed.)
Elsevier, Amsterdam

76. SMITH,S.G., RAO,K.R.N., MASCARO.J.M., LECHA,M., HERRERO,C., MUNIESA,A.M. (1981)
A Comparison of Porphyrin Excretion Patterns from Hepatoerythropoietic Porphyria (HEP) and Porphyria Cutanea Tarda (PCT).
Symp. of Porph., XVI. Congr. Int. Dermat. 37-41

77. STONARD,M.D. (1974)
Experimental Hepatic Porphyrin Induced by Hexachlorobenzene as a Model for Human Symptomatic Porphyria.
Brit. J. Haemat. 27, 617-625

78. STONARD,M.D. (1974)
Effect of Hexachlorobenzene on Hepatic Microsomal Enzymes in the Rat.
Biochem. Pharmacol. 23, 2175-2183

79. STONARD,M.D. (1975)
Mixed Type Hepatic Microsomal Enzyme Induction by Hexachlorobenzene.
Biochem. Pharmacol. 24, 1959-1963

80. TALJAARD,J.J.F., SHANLEY,B.C., JOUBERT,S.M. (1971)
Decreased Uroporphyrinogen Decarboxylase Activity in Experimental Symptomatic Porphyria.
Live Sciences 10, 887-893

81. TESCHKE, R., LIEBER,C.S. (1978)
Biochemie und Pathophysiologie des Alkohol-stoffwechsels,
Leber, Magen, Darm 8, 237-239

82. TIEPERMANN,R.v., DOSS,M. (1978)
Uroporphyrinogen-Decarboxylase in Erythrocyten. Untersuchungen zum primären genetischen Defekt bei chronischer hepatischer Porphyrie.
J. Clin. Chem. Biochem. Vol. 16, 513-517

83. TSCHUDY,D.P., BONKOWSKY,H.L. (1972)
Experimental Porphyria.
Federation Proc. 31, 147-159

84. TYMPNER,F. (1980)
Einfluß von Acetylcystein auf die Viskosität reinen Pankreassekretes bei chronischer Pankreatitis.
Therapiewoche 30, 2059-2060

85. ULLRICH,V. (1977)
Die Rolle des Cytochrom P-450 bei der Aktivierung von Pharmaka.
Arzneimittel-Forsch. 27, 1821-1827

86. ULLRICH,V., FROMMER,V., WEBER,P. (1973)
Differences in the O-Desalkylation of 7-Ethoxycoumarine after Pretreatment with Phenobarbital and 3-Methyl-Cholanthrene.
Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 354, 514-520

87. ULLRICH,V., KREMERS,P. (1977)
Multiple Forms of Cytochrome P-450 in the Microsomal Monooxygenase System.
Arch. Toxicol. 39, 41-50

88. ULLRICH,V., WEBER,P. (1972)
The O-Desalkylation of 7-Ethoxycoumarine by Liver Microsomes.
Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem, 353, 1171-1177

89. VERSTRAETEN,J.-M. (1980)
Mucolytic Treatment in Chronic Airways Obstruction. Double-blind Clinic Trial with Acetylcysteine, Bromhexine and Placebo.
Europ. J. of Respir. Diseases 111, 77-78

90. VIZETHUM,W., BOLSEN,K., SIMON,K., WEBER,K., GOERZ,G. (1980)
Einfluß von Chloroquin auf die Hexachlorbenzol-induzierte Porphyrie.
Untersuchungen in Haut, Leber und Urin.
Arch. Dermatol. Res. 267, 123-130

91. WILLIAMS,R.J.P. (1974)
Haem-Proteins and Oxygen.
In: Iron Biochemistry and Medicine
A.JACOBS, M.WORWOOD (Ed.), Academic Press, London

92. ZANNINI, G., GIRON,G.P., Gritti G. (1980)
Use of Acetylcysteine in the Postoperative Pulmonary Atelectasis.
Europ. J. of Respir. Diseases 111, 74-75

Danksagung

Herrn Professor Dr. G. Plewig danke ich für die Möglichkeit, diese Arbeit an seiner Klinik durchführen zu dürfen.

Herrn Professor Dr. G. Goerz danke ich herzlich für die Überlassung des Themas, sowie für die vielen Anregungen und Hilfestellungen bei der Durchführung der Arbeit.

Herrn K. Bolsen danke ich herzlich für die Einführung in die Methodik, die Hilfe bei der Versuchsdurchführung und bei der Auswertung der Ergebnisse.

Lebenslauf

Am 19. März 1949 wurde ich in Ingolstadt an der Donau/Bayern als einziger Sohn der Eheleute Margot und Eduard Brunner geboren.

Den Besuch der Grundschule begann ich 1955 und setzte diesen nach einem berufsbedingten Wechsel meines Vaters nach Düsseldorf, 1957 an der Grundschule Paulusplatz fort.

1959 wechselte ich an das Städtische Rethelgymnasium Düsseldorf über, das ich 1963 wieder verließ, und an der Städtischen Realschule "In der Lohe" 1966 die Mittlere Reife bestand.

1966 besuchte ich das Städtische Aufbaugymnasium "Am Bonneshof", wo ich 1970 die Reifeprüfung ablegte.

Nach meiner Dienstzeit bei der Bundeswehr nahm ich im Sommersemester 1972 an der RWTH Aachen das Studium der Humanmedizin auf, das ich 1979 mit dem Staatsexamen abschloß.

Seit 1980 befinde ich mich in der Facharztausbildung für Orthopädie und bin nach meiner chirurgischen Zeit im Städtischen Krankenhaus Benrath zur Zeit in der Abteilung für Orthopädie des Johanna-Etienne-Krankenhauses in Neuss beschäftigt.